

Aus der Klinik für Strahlendiagnostik

Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. med. Klaus Jochen Klose

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

DNA-Doppelstrangbrüche nach interventionstradiologischen Eingriffen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Dominik Geisel
aus Freudenstadt

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
20.11.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Hans-Joachim Wagner

Korreferent: PD Dr. Markus Ritter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Röntgenverfahren in der Medizin	6
1.1.1 Erzeugung von Röntgenstrahlung	6
1.1.2 Analoge und digitale Projektionsradiographie.....	6
1.1.3 Computertomographie	7
1.1.4 Perkutane transluminale Angioplastie	8
1.1.5 Dosisbegriffe in der Radiologie	9
1.2 DNA-Schäden und ihre Reparatur	10
1.2.1 Veränderungen der DNA.....	11
1.2.2 Ursachen von DNA-Schäden	11
1.2.3 DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung.....	11
1.2.4 Reparatur von DNA-Strangbrüchen	13
1.2.4.1 Homologe Rekombination (HR)	14
1.2.4.2 Non-Homologous-End-Joining (NHEJ).....	15
1.2.5 Schadenstoleranz	16
1.2.6 DNA-Schäden und die Chromatinstruktur	17
1.2.7 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen	19
2. Ziel der Untersuchung	20
3. Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Geräte.....	22
3.1.2 Chemikalien.....	23
3.1.3 Medien und Waschlösungen.....	23
3.1.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	24
3.1.5 Blutentnahme.....	24
3.1.6 Eukaryote Zelllinien	24
3.1.7 Sonstige Materialien	25
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Zellkultur	25
3.2.2 Bestimmung der Dosis.....	25

3.2.3 <i>In vitro</i> -Bestrahlung.....	25
3.2.4 Computertomographie	26
3.2.5 Perkutane transluminale Angioplastie	26
3.2.6 Dichtegradientenzentrifugation	26
3.2.7 Fixierung	27
3.2.8 Immunfluoreszenzfärbung	27
3.2.9 Mikroskopische Auswertung	28
3.2.10 Statistische Auswertung	28
3.3 Patientenuntersuchung.....	29
3.3.1 Studienprotokoll.....	29
3.3.2 Einverständnis	29
3.3.3 Patientenkollektiv	29
3.3.4 Ein- und Ausschlusskriterien	29
3.3.5 Blutentnahme.....	30
3.3.6 Zeitplan der Untersuchungen	30
4. Ergebnisse	32
4.1 γ -H2AX-Foci nach in-vitro Bestrahlung von humanen Fibroblasten proportional zur Bestrahlungsdosis.....	32
4.2 γ -H2AX-Foci nach in-vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten proportional zur Bestrahlungsdosis.....	33
4.3 γ -H2AX-Foci nach Computertomographie	34
4.4 γ -H2AX-Foci nach perkutaner transluminaler Angioplastie	36
4.4.1 Zusätzliche selektive Blutentnahme aus der bestrahlten Extremität	39
5. Diskussion	41
5.1 Quantifizierung der durch ionisierende Strahlung in Fibroblasten und Lymphozyten verursachten DNA-Doppelstrangbrüche	41
5.2 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch γ -H2AX-Foci nach Computertomographie	42
5.3 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch γ -H2AX-Foci nach perkutaner transluminaler Angioplastie	43
5.4 Methodik	47
5.5 Ausblick	48
Literaturverzeichnis.....	50
Zusammenfassung.....	56

Lebenslauf.....	58
Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	59
Danksagung.....	60
Ehrenwörtliche Erklärung.....	61

1. Einleitung

1.1 Röntgenverfahren in der Medizin

1.1.1 Erzeugung von Röntgenstrahlung

Am 8. November 1895 durch Wilhelm Conrad Röntgen entdeckt, veröffentlichte er seine Entdeckung unter dem Titel „Über eine neue Art von Strahlen“ und betitelte sie zuerst als "X-Strahlen". Heute sind Sie im deutschen Sprachraum nur noch als "Röntgenstrahlen" bekannt. Sie entstehen durch den Aufprall von energiereichen Elektronen, die aus einer beheizten Kathode austreten und durch die angelegte Hochspannung in Richtung Anode beschleunigt werden. Am Metall der Anode werden die freien Kathodenelektronen abgebremst und treten in Wechselwirkung mit den Atomen und Hüllelektronen der Anode. Durch den Aufprall des freien Elektrons wird dem Hüllelektron Energie übertragen, so dass es von einem kernnahen auf ein kernfernes Orbital angehoben (Anregung) oder aus dem Atomverband herausgeschleudert wird (Ionisation). Der freiwerdende Platz wird durch Elektronen der äußeren Schalen mit einem höheren Energiepotential unter Abgabe von Energie besetzt. Diese abgegebene Energie wird in Röntgenstrahlung oder in Wärme umgewandelt.

Das Röntgenbremsspektrum entsteht aus der energiereichen, kurzwelligen und der energieärmeren, langwelligen Röntgenstrahlung. Mit der Erhöhung der Röhrenspannung werden die Kathodenelektronen in der Röntgenröhre zunehmend beschleunigt und die emittierte, kurzwellige Röntgenstrahlung aufgehärtet, d.h. die Durchdringungskraft der Strahlung wird vergrößert. Die Intensität der Röntgenbremsstrahlung wird in erster Linie vom Heizstrom an der Kathode beeinflusst: je höher die Röhrenstromstärke, desto mehr Elektronen verlassen die Glühkathode pro Sekunde (Morneburg 1995).

1.1.2 Analoge und digitale Projektionsradiographie

Bei den klassischen Filmfolien-Aufnahmen handelt es sich um Zentralprojektionen, d.h. der Strahlengang verläuft orthogonal zur Filmebene. Aufgrund der unterschiedlichen Strahlenabsorption der untersuchten Körperpartien entsteht auf dem Röntgenfilm ein die Schwächungsunterschiede widerspiegelndes Strahlenbild.

Bei der Speicherfolien-Radiographie werden die Standardröntgenfilme durch eine Halbleiterplatte (Speicherfolie) ersetzt. Durch die Belichtung der Speicherfolie mit Röntgenquanten werden Elektronen im Kristallgitter auf ein höheres energetisches Niveau

angehoben, dass der Intensität der aus dem Patienten austretenden Röntgenstrahlung proportional ist. Bei der Auslesung führt ein Laserstrahl der Speicherfolie Energie zu und bewirkt ein Rückkehren der angeregten Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau unter Aussendung von Licht. Diese Lichtemissionen werden von einem Photomultiplier gemessen und die analogen Bildsignale in digitale Werte umgewandelt (A/D-Wandler). Nach diesem Schritt folgt die digitale Bildnachbearbeitung. Wie in verschiedenen Phantomstudien nachgewiesen wurde, kann durch eine fragestellungsadaptierte Auswahl der Untersuchungsparameter eine zusätzliche Reduktion der Strahlenexposition erzielt werden (Wright *et al.* 1995; Holje *et al.* 1997; Heyne *et al.* 1999; Piraino *et al.* 1999; Heyne *et al.* 2000).

1.1.3 Computertomographie

Die Computertomographie wurde möglich durch die Nutzung des mathematischen Verfahrens, das 1917 von dem österreichischen Mathematiker Johann Radon entwickelt wurde. Damals ein rein mathematischer Erkenntnisgewinn fern jeglicher Anwendungsmöglichkeiten, bildet die Umkehr der Radontransformation heute die Grundlage zur Berechnung von räumlichen Aufnahmen eines Objektes mit seinen Innenstrukturen aus den Röntgenschwächungskoeffizienten in Abhängigkeit des Ortes in einer Schicht (Radon 1917).

Nach Vorarbeiten des Physikers Allan M. Cormack in den 1960er Jahren realisierte der Elektrotechniker Godfrey Hounsfield mehrere Prototypen eines Computertomographen. Die erste CT-Aufnahme an einem Menschen wurde 1971 vorgenommen (Hounsfield 1973). Die Röntgenstrahlen, die durch das Untersuchungsobjekt geschickt werden, werden von mehreren gegenüber liegenden Detektoren gleichzeitig aufgezeichnet. Der Vergleich zwischen ausgesandter und gemessener Strahlungsintensität gibt Aufschluss über die Abschwächung der Strahlung durch das zu untersuchende Gewebe. Die Daten werden im Computer zu einem Volumendatensatz zusammengefügt, aus dem Schnittbilder und 3D-Ansichten in beliebigen Ebenen rekonstruiert werden können.

Die Computertomographie wird heute aufgrund ihrer hohen diagnostischen Aussagekraft ubiquitär in der Medizin eingesetzt. Sie basiert auf einem klar definierten Bestrahlungsprotokoll und deckt einen relativ breiten Dosisbereich ab. Ihre erhöhte Aussagekraft gegenüber einer konventionellen Röntgenaufnahme wird aber auch durch eine signifikant höhere Strahlenexposition erreicht. Die effektive Dosis des Patienten im Rahmen einer konventionellen Röntgenaufnahme des Thorax beträgt ungefähr 0,02 mSv, die effektive Dosis einer Computertomographie des Thorax bewegt sich in der Größenordnung um 8 mSv (International Commission on Radiological Protection 2000). Neuere Untersuchungen an

modernen CT-Scannern mit mehreren Detektorzeilen und gleichzeitiger Akquisition mehrerer Schichten kommen auf noch höhere Werte (Dawson 2004; Groves *et al.* 2004). Die Entwicklung der letzten Jahre versucht über Dosismodulationen (adaptive scanning) eine Reduktion der Strahlenexposition insbesondere für die moderne Mehrzeilencomputertomographie zu realisieren (Mastora *et al.* 2004).

1.1.4 Perkutane transluminale Angioplastie

Die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) bietet eine vergleichsweise wenig invasive Methode zur Eröffnung von arteriellen Obstruktionen. Nach ihrer Einführung durch den Radiologen Charles Dotter im Jahre 1964 (Dotter *et al.* 1964) und der Weiterentwicklung durch Gruntzig 1974 (Gruntzig *et al.* 1974) mit einem Ballonkatheter ist die PTA bei klinisch und hämodynamisch relevanten iliakalen und femoropoplitealen Stenosen, kurzstreckigen Beckenarterienverschlüssen oder Verschlüssen der Unterschenkelarterien die Behandlungsmethode der Wahl (Schneider *et al.* 1982; Norgren *et al.* 2007).

Bei der PTA werden mittels eines Ballonkatheters Arterienverschlüsse bzw. -stenosen aufgedehnt, das wandadhärente und plastisch kaum verformbare Verschlussmaterial in die Media der Gefäßwand gedrückt und die Gefäßwand lokal überdehnt (Dotter *et al.* 1964; Roth *et al.* 1996); es resultieren methodenbedingte Risse der Intima und Media (Dissektionen). Technisch erfolgt die PTA nach Lokalanästhesie der Punktionsstelle in Seldinger-Technik und unter Verwendung einer sog. Schleuse zum Minimieren des Punktions- und Kathetertraumas an der Gefäßwand.

Die PTA erfolgt heutzutage in digitaler Subtraktionsangiographie-Technik (DSA) zur selektiven Gefäßdarstellung. Hierbei wird zuerst einer Leeraufnahme (Maske) der zu untersuchenden Körperregion hergestellt. Anschließend erfolgen die Injektion eines Kontrastmittelbolus und die erneute Anfertigung eines Röntgenbildes. Nun erfolgt quasi in Echtzeit eine Subtraktion der Maske vom Gefäßbild und dadurch eine Eliminierung der statischen Bildelemente wie Skelett- und Weichteilstrukturen (Mistretta *et al.* 1981). Die eingesetzten Anlagen arbeiten mit verschiedenen Arten der Röntgenstrahlenexposition, die zu unterschiedlichen Strahlendosen für den Patienten führen. Beim kontinuierlichen Betrieb sind Bilder mit Bildfrequenzen von 25-50 Bildern/s möglich. Diese Methode ist zur Darstellung von dynamischen Vorgängen geeignet z.B. Herzfunktionsuntersuchungen. Beim gepulsten Betrieb werden Einzelbilder mit einer Frequenz von 1-6 Bildern/s erzeugt, was im Vergleich zum durchgängigen Röntgenbetrieb zu einer 0,11-fachen Dosis bei beispielsweise 3 Bildern/s führt (Miller *et al.* 2003).

Aus der technischen Durchführung der PTA ergibt sich, dass der Patient über einen deutlich längeren Zeitraum (bis zu einer Stunde) ionisierender Strahlung ausgesetzt ist, als beispielsweise bei konventionellen Röntgenaufnahmen. Die kumulative Dosis bewegt sich laut der RAD-IR Studie für verschiedene interventionsradiologische Maßnahmen im Bereich von durchschnittlich 1.284 mGy bei einer perkutanen transluminalen Angioplastie (Miller *et al.* 2003; Miller *et al.* 2003; Balter *et al.* 2004).

1.1.5 Dosisbegriffe in der Radiologie

Es existieren verschiedene Einheiten der Quantifizierung einer Röntgenstrahlenexposition, die je nach Anwendungszweck unterschiedlich gut zur deren Beschreibung geeignet sind.

Die *Energiedosis*

$$D = \frac{E}{m}$$

mit der Einheit Gray (Gy) betrachtet die Strahlenwirkung in Abhängigkeit zu der Energiemenge, die in einer Substanz aus der eintreffenden Strahlung absorbiert wird. Die *Äquivalentdosis*

$$H = \omega_R \cdot D$$

mit der Einheit Sievert (Sv) ist notwendig, um die unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit der verschiedenen Strahlenarten zu quantifizieren. Bei den in der diagnostischen Radiologie angewendeten Röntgen- und Gammastrahlen ist die relative biologische Wirksamkeit ω_R gleich 1, es gilt daher 1 Sv = 1 Gy. Für Alphateilchen beispielsweise beträgt ω_R dagegen 20.

Zur Charakterisierung von komplexen radiographischen Untersuchungen mit wechselnden Projektionen, z.B. Durchleuchtungsuntersuchungen ist das *Dosisflächenprodukt* (DFP, engl. DAP) eine geeignete Messgröße. Es hat die Einheit $Gy \cdot cm^2$ und bezeichnet die gesamte, bei einer bestimmten Untersuchung das Röhren-Austrittsfenster passierende Strahlenmenge, noch nicht durch die Fläche des Strahlenbündels dividiert. Das Dosisflächenprodukt ist unabhängig vom Abstand zur Strahlenquelle. Unter der theoretischen Annahme einer punktförmigen Strahlenquelle wächst zwar mit steigender Entfernung die durchstrahlte Fläche quadratisch, die Strahlungsintensität und damit die Dosis nehmen aber in gleichem Maße ab. Über eine an der Tiefenblende montierte Ionisationskammer wird die ionisierende Strahlung gemessen und das belichtete Untersuchungsareal aus der Öffnung der Tiefenblende ermittelt. Durch Korrelation mit Organdosen bzw. sog. Monte Carlo - Berechnungen lassen sich Umrechnungsfaktoren zur Ermittlung der Effektivdosis erstellen.

Die *Oberflächendosis* (OD, engl. ESD) mit der Einheit Gray ist die auf der Oberfläche des bestrahlten Körpers gemessene Energiedosis, inklusive der Rückstreuung. Sie wird meist durch eine an der Hautoberfläche angebrachte Ionisationskammer oder ein Thermolumineszenzdosimeter ermittelt. Sie ist beispielsweise zur Abschätzung des Risikos deterministischer Strahlenschäden wie Strahlenveränderungen der Haut (Erythem, Verbrennung) sinnvoll.

Zur Beschreibung der Gesamtdosis einer CT-Untersuchung eignet sich das Dosislängenprodukt (DLP)

$$DLP = CTDI \cdot \text{Schichtdicke} \cdot \text{Schichtanzahl}$$

an. Der CTDI (engl., = computed tomography dose index) ist definiert als die gemessene Dosis einer Einzelschicht einer bestimmten Dicke und Strahlenqualität. Er ist für jedes CT-Gerät vom Hersteller bekanntzugeben. Das DLP korreliert über Konversionsfaktoren gut mit der Effektivdosis einer Untersuchung.

Bei allen Anwendungen ionisierender Strahlen bezeichnet die *Effektivdosis* D_{eff} in der Einheit Sievert (Sv) die Summe der bei einer bestimmten Strahlenexposition auftretenden Organdosen, multipliziert mit dem jeweiligen Wichtungsfaktor dieser Organe. Der Wichtungsfaktor berücksichtigt die unterschiedliche Empfindlichkeit menschlicher Organe gegenüber Strahlung. Die Haut des Menschen ist z.B. weit weniger empfindlich gegenüber einer Strahlenexposition als die inneren Organe. Besonders strahlensensibel sind Keimdrüsen, Dickdarm, Knochenmark, Magen und Lunge. Die Effektivdosis stellt den Versuch einer auf den gesamten Körper umgelegten Darstellung der biologischen Wirksamkeit einer Strahlenexposition dar. Sie kann durch Umrechnungsfaktoren z.B. aus dem Dosis-Flächenprodukt oder der Eintrittsoberflächendosis berechnet werden (Le Heron 1992; Schmidt 1998).

1.2 DNA-Schäden und ihre Reparatur

Die Nukleinsäure ist ein Polymer aus Mononukleotiden, bestehend aus einer Base, dem Zucker Ribose und Phosphat. Als nukleäre DNA ist sie der universelle Träger genetischer Information. Mit Histonproteinen zusammen bildet sie das sog. Chromatin und durchläuft während der Zellteilung bestimmte morphologische Veränderungen in Form von Chromosomen. Die Replikation und Transkription der DNA wird über komplexe Multienzymsysteme reguliert und katalysiert, denn die DNA stellt den Bauplan der gesamten Proteine einer Zelle dar und

ermöglicht so die Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels. Die DNA dient als Träger des Erbgutes zur Weitergabe dieses „Bauplans“ an folgende Zellgenerationen. Beide Funktionen erfordern die Sicherung der Stabilität der DNA und der in ihr kodierten Information.

1.2.1 Veränderungen der DNA

Die DNA einer Zelle ist ständig den direkten oder indirekten Einflüssen von Stoffwechselvorgängen ausgesetzt, die ihre molekulare Struktur verändern können (Friedberg 1995; Friedberg 2003). Teilweise sind solche Veränderungen für die Aufrechterhaltung oder Erfüllung der Funktion der DNA notwendig, zum Beispiel bei der Einfügung von transienten Strangbrüchen bei der Reifung von Antikörper-produzierenden Zellen (Schrader *et al.* 2005), der kurz nach der Replikation durchgeführten Methylierung einzelner Basen (Holliday *et al.* 2002), oder durch Topoisomerasen bei der Replikation (Degrassi *et al.* 2004). Die weit überwiegende Zahl solcher Veränderungen entsteht jedoch nicht als notwendiges oder vorgesehenes Ereignis, sondern ist als Grundlage von Mutationen potentiell für die Zelle oder den Gesamtorganismus bedrohlich. (Lindahl *et al.* 1974; Rydberg *et al.* 1982; Nakamura *et al.* 1998).

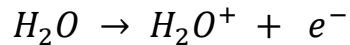
1.2.2 Ursachen von DNA-Schäden

Schäden an der DNA können sowohl exogen, z.B. durch ionisierende oder ultraviolette Strahlung oder mutagene Chemikalien, als auch endogen, z.B. spontan oder durch Stoffwechselprodukte wie freie Radikale, entstehen (Friedberg 2003; Valerie *et al.* 2003). Im Folgenden soll auf die durch ionisierende Strahlung verursachten Schäden genauer eingegangen werden.

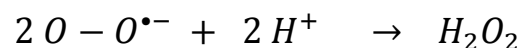
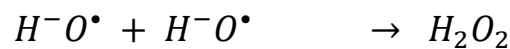
1.2.3 DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung

Die durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Schäden können in direkte und indirekte Schäden unterteilt werden (Friedberg *et al.* 2006). Indirekte Schäden entstehen, wenn die einfallende Strahlung von Wassermolekülen - oder in geringerem Maße durch andere Moleküle, z.B. Proteine - absorbiert wird. Da Wasser das häufigste Molekül jeder Zelle darstellt, wird geschätzt, dass beinahe die gesamte absorbierte Energie der ionisierenden Strahlung in der Radiolyse des Wassers verbraucht wird (Ward 1988; Riley 1994). Dabei laufen zwei Vorgänge ab:

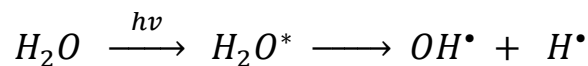
1. Ist die Energie der einfallenden Photonen hoch genug, um direkt ein Elektron aus dem Wassermolekül herauszuschlagen, so entsteht ein hochreaktives und kurzlebiges Wasser-Radikalkation:



Fast 80 % der absorbierten Energie in einer Zelle entfällt auf diese Reaktion. Im Folgenden kommt es zur Bildung verschiedener reaktiver, aber relativ langlebiger Produkte wie OH^\bullet , $O_2^{\bullet-}$ oder $H_2O_2^\bullet$, die dann mit anderen Molekülen, z.B. mit der DNA reagieren können:



2. Die übrigen 20 % der absorbierten Energie entfallen auf die Aktivierung von Wassermolekülen und den in einem zweiten Schritt erfolgenden Zerfall in zwei Radikale:



Bei den direkten Schäden wird die Strahlungsenergie direkt auf die DNA übertragen und führt zur Ionisierung von Basen oder Zuckern der DNA (Ward 1988). Die sich ergebenden Schäden können dieselben sein, wie die auf indirektem Wege entstehenden. Nur ein geringer Teil der die Zelle treffenden Energie führt zu direkten DNA-Schäden, während der größte Teil, wie oben erwähnt, auf die Radiolyse von Wasser entfällt. Die relative Häufigkeitsverteilung der DNA-Schäden auf direkte und indirekte Mechanismen ist deutlich auf die Seite der direkten DNA-Schäden verschoben, da der größte Teil der Radiolyseprodukte des Wassers nicht mit der DNA, sondern mit anderen Bestandteilen der Zelle - z.B. Proteinen oder Lipiden - weiterreagiert. Während annähernd 99 % der Strahlungsenergie auf die Radiolyse des Wassers entfallen, entstehen nur circa zwei Drittel der DNA-Schäden auf diesem Weg. Das übrige Drittel der DNA-Schäden wird durch direkte Einwirkung der ionisierenden Strahlung auf die DNA verursacht (Friedberg *et al.* 2006). Ionisierende Strahlung verursacht Veränderungen an allen Bestandteilen der DNA. Beispiele für durch ionisierende Strahlung verursachte Basenveränderungen sind in Abbildung 1-1 dargestellt.

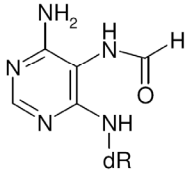
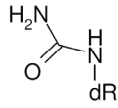
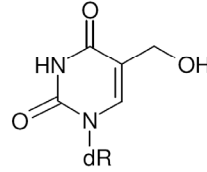
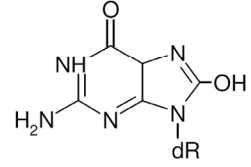
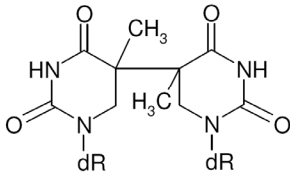
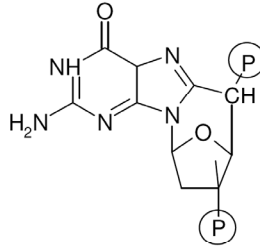
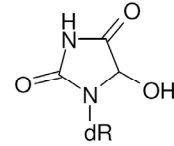
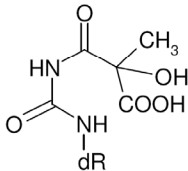
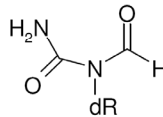
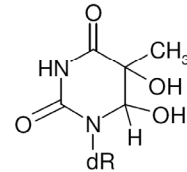
4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin**Harnstoff****5-Hydroxymethyluracil****8-Hydroxyguanin****C(5)-C(5') Thymindihydrodimer****8,5'-Cyclodeoxyguanosin****5-Hydroxyhydantoin****Methyltartronylharnstoff****Formamidoharnstoff****Thyminglykol**

Abbildung 1-1: Typische Reaktionsprodukte nach Einwirken von ionisierender Strahlung auf DNA-Basen (nach Friedberg *et al.*, 2006)

Über die Veränderung einzelner Basen hinaus, die entweder die Transkription und Replikation behindern oder durch Basenfehlpaarungen zu Mutationen führen können, kann durch ionisierende Strahlung die Integrität des gesamten DNA-Moleküls beeinträchtigt werden, denn ionisierende Strahlung kann alle Bestandteile der DNA beeinflussen. Sie kann direkt zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen (Lobrich *et al.* 1996). Die so entstandenen Veränderungen treten in unterschiedlichem Maße auf. So verursacht 1 Gray γ -Strahlung in einer Zelle ca. 250 Thyminveränderungen, ca. 600 - 1.000 DNA-Einzelstrangbrüche und ca. 16 - 40 DNA-Doppelstrangbrüche (Ward 1988).

1.2.4 Reparatur von DNA-Strangbrüchen

Für die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen ist von Bedeutung, dass der nicht unterbrochene Strang zum einen den unterbrochenen Strang in Position hält und zum anderen gleichzeitig als Matrize für die Synthese etwaig fehlender Basen fungieren kann. Tritt ein DNA-Einzelstrangbruch auf, so bindet nach erfolgter Erkennung der Läsion ein Reparaturkomplex, bestehend unter anderem aus PARP und XRCC1, an den Läsionsort. Im Folgenden werden

weitere Proteine wie PNK und Pol β rekrutiert. Zunächst wird der Einzelstrangbruch durch PNK so prozessiert, dass anschließend Pol β etwaige Lücken schließen kann und der Einzelstrangbruch durch die DNA-Ligase 3 ligiert werden kann (Friedberg *et al.* 2006).

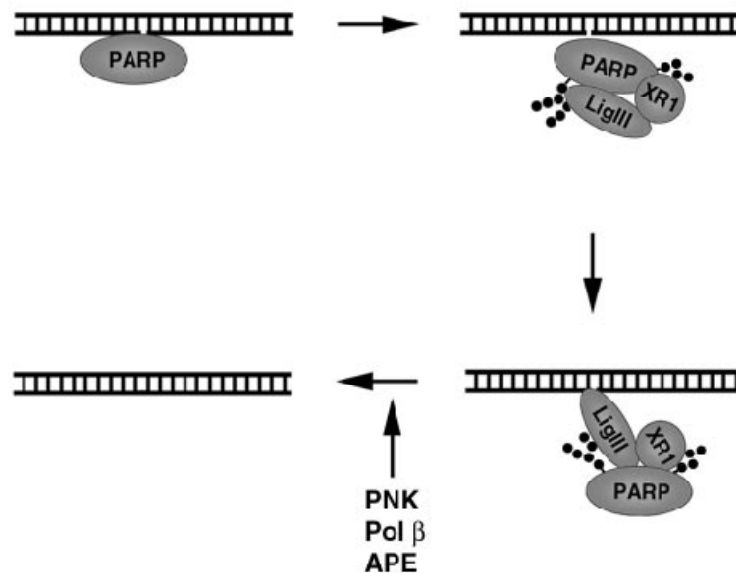


Abbildung 1-2: Einzelstrangbruchreparatur (Leppard *et al.* 2003)

Bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen besteht zunächst das Problem, dass beide Stränge durch die Durchtrennung auseinander diffundieren und so möglicherweise nicht korrekt zusammengefügt werden können. Mögliche Mechanismen, die dies verhindern sollen, sind weiter unten beschrieben. Für die Reparatur solcher Schäden existieren unterschiedliche Mechanismen. Zu diesen gehören die homologe Rekombination (HR) und die Verbindung nicht-homologer Bruchenden, engl. Non-Homologous-End-Joining (NHEJ). Siehe auch Abbildung 1-4.

1.2.4.1 Homologe Rekombination (HR)

Wenn die jeweiligen Bruchenden genügend Homologien zu einem anderen DNA-Strang (in der Regel das jeweils entsprechende Schwesterchromatid) aufweisen, so kann ein Doppelstrangbruch durch homologe Rekombination repariert werden (Dudas *et al.* 2004). Dabei wird entweder die intakte Schwesterchromatide oder das homologe Chromosom herangezogen, um die Bruchenden zu binden, etwaige fehlende Anteile zu resynthetisieren und die defekte Chromatide zu komplettieren (Dudas *et al.* 2004; Friedberg *et al.* 2006). Während dieses Vorganges kommt es zu einem Austausch von DNA-Strängen zwischen den beiden beteiligten Chromosomen, so dass dieser Vorgang als so genannter Schwesterchromatid-Austausch („sister chromatid exchange“ (SCE)) nachgewiesen und als

Marker für stattgefundene homologe Rekombination genutzt werden kann. Hierbei sind insbesondere der Mre11-Rad50-Komplex, Rad51 und Rad52 von Bedeutung. Der Mre11-Rad50-Komplex prozessiert die DNA-Bruchenden und verbindet die Schwesterchromatiden miteinander. Reparatur durch homologe Rekombination bedeutet in der Regel, dass keine genetische Information verloren geht, wenn die Schwesterchromatide als Matrize verwendet wurde (Paques *et al.* 1999).

1.2.4.2 Non-Homologous-End-Joining (NHEJ)

Anders als bei der homologen Rekombination ist für das direkte Verbinden der Bruchstücke durch „Non-Homologous-End-Joining“ (NHEJ) nicht die Verwendung der Schwesterchromatide oder des homologen Chromosoms notwendig, da hierbei die Enden des gebrochenen Doppelstranges direkt miteinander verbunden werden (Paques *et al.* 1999). Dies hat den Vorteil, dass eine Bindung von großen homologen Bereichen an ein anderes Chromosom nicht erforderlich ist. Gleichzeitig bedeutet dies aber, dass dieser Reparaturmechanismus gerade in einem Genom mit mehreren eng beieinander liegenden DNA-Doppelstrangbrüchen stärker zu Fehlverbindungen und zu chromosomalen Umlagerungen neigt, als dies bei der homologen Rekombination der Fall ist. Einen Überblick über die beteiligten Proteine liefert Abbildung 1-3.

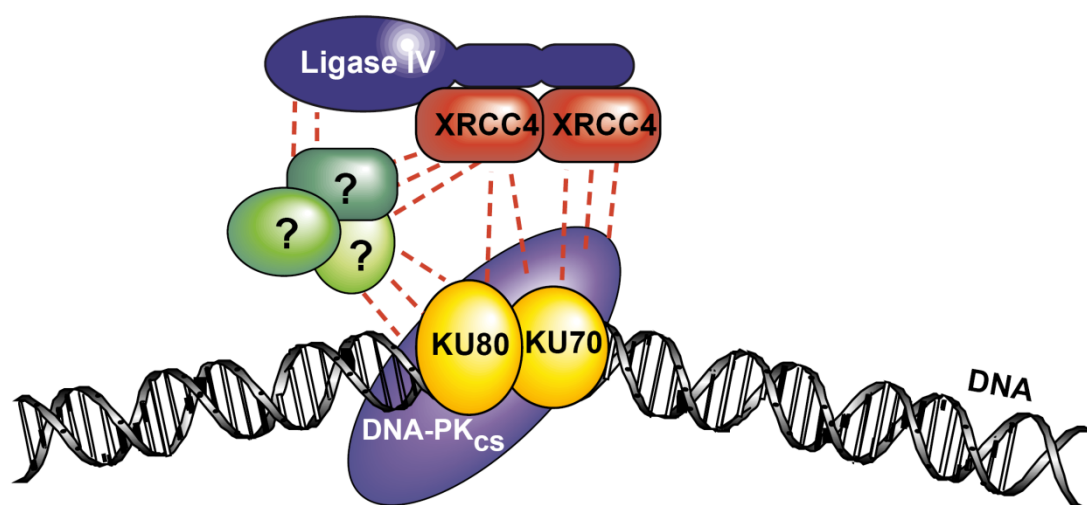


Abbildung 1-3: Modell des Non-Homologous-End-Joining-Komplexes bei Säugetieren. Der Ku-Heterodimer bindet an freie DNA-Enden und rekrutiert die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{cs}). Anschließend wird ein DNA-Ligase-IV-XRCC4-Komplex zum Ort des Doppelstrangbruchs rekrutiert und interagiert entweder direkt oder indirekt zusammen mit anderen, noch unbekannten, Komponenten des NHEJ-Komplexes (Critchlow *et al.* 1998).

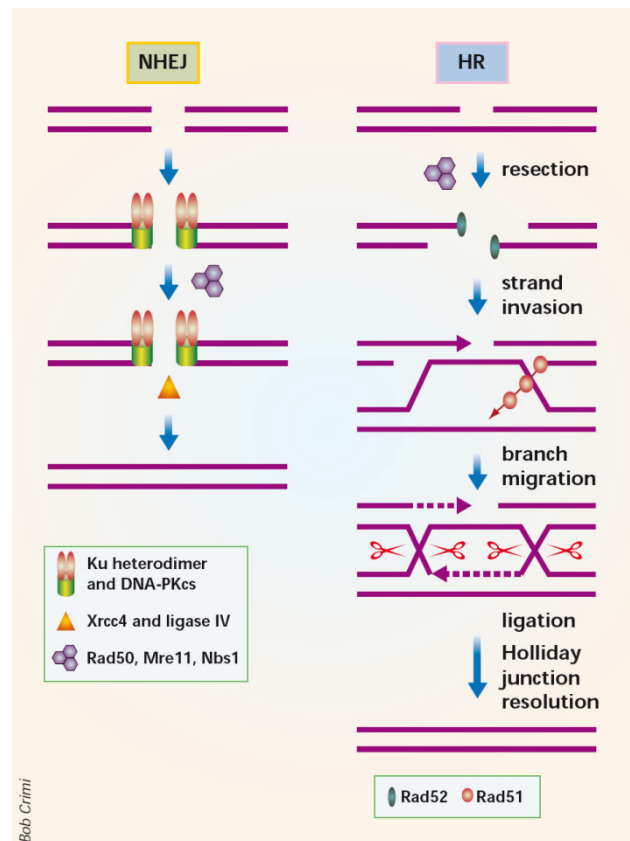


Abbildung 1-4: Vergleich der beiden Wege der DSB-Reparatur. NHEJ verbindet die beiden Bruchenden direkt, führt aber im Allgemeinen zu kleinen Deletionen. NHEJ erfordert das DNA-Enden-bindende Protein Ku, welches die DNA-PK_{CS} rekrutiert. Anschließend wird Xrcc4 zusammen mit der DNA-Ligase IV rekrutiert. Der Rad50-Mre11-Nbs1-Komplex, der eine Helikasen- und eine Exonukleasenaktivität besitzt, hat möglicherweise ebenfalls eine Funktion beim NHEJ, besonders wenn die DNA-Bruchenden vor der Ligierung prozessiert werden müssen. Homologe Rekombination (HR) erfordert Rad52, ein DNA-Enden-bindendes Protein, und Rad51, welches Filamente um den entwundenen DNA-Strang bildet, um die Strandinvasion zu ermöglichen. Das gebrochene 3'-Ende infiltriert einen homologen DNA-Doppelstrang und wird mittels DNA-Polymerase erweitert. In meiotischen Zellen werden die Enden durch die DNA-Ligase I ligiert und die verwundenen DNA-Stränge (Holliday-Strukturen) werden entzerrt. Dies führt entweder zu Crossing over- oder zu nicht Crossing over-Genprodukten (Khanna *et al.* 2001).

1.2.5 Schadenstoleranz

Wird ein DNA-Schaden, der die DNA-Replikation beeinträchtigt, nicht behoben, so kann die betroffene Zelle entweder durch Apoptose aus dem Organismus entfernt werden, durch Seneszenz die Fähigkeit zur weiteren Proliferation verlieren, oder den Schaden tolerieren und weiter proliferieren. Diese verschiedenen Wege werden durch das Zusammenwirken verschiedener Proteine reguliert. Dabei hängt die Entscheidung für einen dieser Wege unter anderem von der Art der Zelle, der Art des Schadens, der Anzahl an Schäden im gesamten zellulären Genom und dem Zeitpunkt im Zellzyklus ab (Friedberg *et al.* 2006; Hussain *et al.* 2006).

Neben der oben beschriebenen homologen Rekombination, die außer der Reparatur von DNA-Strangbrüchen auch für die Umgehung von nicht reparierten DNA-Schäden bedeutsam ist, ist die Transläsionssynthese ein weiterer Mechanismus der Schadenstoleranz (Friedberg *et al.* 2006). Dabei fungieren besonders unselektive DNA-Polymerasen als „Rettungsproteine“, die es ermöglichen, an Läsionen vorbei zu synthetisieren, die die normale DNA-Replikation blockieren. Diese Polymerasen der Pol-Y Familie sind in der Lage, die DNA-Replikation über eine Läsion hinweg fortzuführen. Dies ist möglich, indem sie durch ihre unselektive Bindung an die DNA auch stark deformierende Läsionen des Matrizenstranges binden und im Tochterstrang Basen einbauen können, die nicht unbedingt den komplementären Basen der geschädigten Basen des Matrizenstranges entsprechen. Gleichzeitig binden sie DNA nur schlecht und können nur einige Basen synthetisieren bevor sie von der DNA abfallen. Dies stellt sicher, dass diese DNA-Polymerasen nicht mit der normalen DNA-Replikation interferieren und nur an den Stellen in größerem Maße aktiv werden können, an denen die normale, sehr viel fehlerärmere Replikation nicht möglich ist (Wang 2001).

1.2.6 DNA-Schäden und die Chromatinstruktur

Das Chromatin besteht aus der DNA und einer großen Anzahl von Proteinen. Es stellt in seiner Gesamtheit die strukturelle Basis des Zellkerns dar. Die Chromatinstruktur wird durch Nukleosomen bestimmt, die als kleinste Untereinheit der Chromatinstruktur betrachtet werden können (Takahashi *et al.* 2005). Ein Nukleosom besteht aus einem etwa 100 kDa großen Proteinkomplex aus jeweils zwei Kopien von vier verschiedenen Histonproteinen, um die die DNA in zwei superhelikalen Schleifen von insgesamt 146 Basenpaaren Länge gewickelt ist. Jedes Nukleosom wird durch einen kurzen Abschnitt von Verbindungs-DNA („linker-DNA“, die mit einem Verbindungshiston, „linker-histone“, komplexiert ist) mit dem nächsten Nukleosom verknüpft. (Hansen 2002; Luger 2003).

Diese niedrigste Stufe der DNA-Verpackung im Kern wurde von Foster und Downs, 2005 als Perlenkette beschrieben (Foster *et al.* 2005). Von dieser Stufe ausgehend wird die DNA noch dichter gepackt. Die Verpackung von DNA in Form von Nukleosomen erlaubt einerseits eine Verdichtung, andererseits behindert sie notwendige Stoffwechselvorgänge, wie die Replikation, Transkription und die DNA-Reparatur. Neben der reinen „Verpackungsfunktion“ spielen Histone eine Rolle bei der Modulation dieser Vorgänge. Die vier Histone eines Nukleosoms sind die Histone H2A, H2B, H3 und H4, das Verbindungshiston gehört zur Histonfamilie H1 (Redon *et al.* 2002).

Um die Funktion von Replikations-, Transkriptions- und Reparaturproteinen zu erleichtern, gibt es mehrere Mechanismen, mit deren Hilfe die Chromatinstruktur lokal verändert werden kann. Dazu gehören ATP-abhängige Reaktionen, kovalente Veränderungen von Histonen, z.B. Acetylierung, Deacetylierung oder Phosphorylierung, und der Austausch von Histonvarianten derselben Histonfamilie (West *et al.* 1980; Mersfelder *et al.* 2006).

Ein Beispiel für kovalente Veränderungen stellt die Phosphorylierung des Histons H2AX an Serin 139 in der Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. Die am Serin 139 phosphorylierte Form von H2AX wird in der Literatur als γ -H2AX, in einigen Veröffentlichungen auch als H2AXS139ph oder phopho-H2AX, bezeichnet (Rogakou *et al.* 2000; Ward *et al.* 2001; Pilch *et al.* 2003; Foster *et al.* 2005). Im Folgenden wird die üblichere Bezeichnung γ -H2AX verwendet.

H2AX macht etwa 10 % der H2A Population innerhalb des Chromatins aus und scheint innerhalb des Chromatins gleichmäßig verbreitet zu sein (Mannironi *et al.* 1989). Entsteht in einem DNA-Strang ein Doppelstrangbruch, so werden innerhalb weniger Minuten mehrere Tausend H2AX-Proteine zu γ -H2AX phosphoryliert (Rogakou *et al.* 1998; Pilch *et al.* 2003; Rothkamm *et al.* 2003). Dabei findet die Phosphorylierung in der unmittelbaren Umgebung des Strangbruches statt und breitet sich radial aus, so dass schließlich H2AX-Moleküle bis zu einigen Megabasen Entfernung von dem Strangbruch phosphoryliert werden (Rogakou *et al.* 1999). γ -H2AX bildet zusammen mit Reparaturproteinen und Proteinen, die den Zellzyklus als Checkpointproteine regulieren, als nukleäre Foci nachweisbare Komplexe (s. Abbildung 1-5)

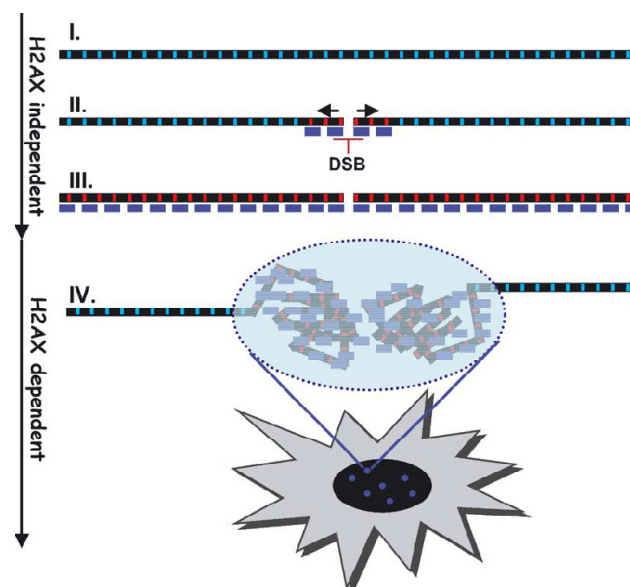


Abbildung 1-5 - Modell der Rolle der H2AX-Phosphorylierung in der Chromatinkondensation nahe DNA-Doppelstrangbrüchen (Fernandez-Capetillo *et al.* 2004)

Zu den beteiligten Proteinen gehören das 53BP1, der Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex, Mdc1, Rad 51 und das BRCA1 (Furuta *et al.* 2003; Pilch *et al.* 2003). Dabei scheint γ -H2AX einerseits die Funktion eines Ankers zu haben, der für die Rekrutierung und korrekte sterische Anordnung der Reparaturkomplexe in der Umgebung des DNA-Schadens notwendig ist, andererseits vermittelt γ -H2AX über die oben genannten Checkpointproteine das Signal, dass eine potentiell letale Läsion vorhanden ist. Eine weitere Funktion ist die Fixierung der beiden Bruchenden und das Lenken der Reparatur in Richtung der fehlerfreieren homologen Rekombination (Fernandez-Capetillo *et al.* 2004).

1.2.7 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche können durch eine Reihe von Methoden quantifiziert werden, zu diesen gehören die Pulsfeldgelelektrophorese (Whitaker *et al.* 1991), der Comet Assay (Fairbairn *et al.* 1995) oder die TUNEL Methode (Hewitson *et al.* 2006). All diesen Methoden ist gemeinsam, dass sie nicht sensitiv im Bereich von wenigen Doppelstrangbrüchen pro Zelle sind. So liegt die Grenze, ab der Doppelstrangbrüche sicher vom Hintergrund unterschieden werden können, beim Comet Assay, bei einer Strahlendosis von etwa 4 Gy (Lobrich *et al.* 2006). Bei dieser Strahlendosis werden pro Zelle bereits etwa 160 DNA-Doppelstrangbrüche verursacht (Friedberg *et al.* 2006). Durch die Studien von Rothkamm und Löbrich konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Darstellung von γ -H2AX Foci mittels Immunfluoreszenz möglich ist. Dabei stimmen die darstellbaren Foci nach Bestrahlung mit schweren Ionen und nach Bestrahlung mit ionisierender Photonenstrahlung sowohl mit der erwarteten Anzahl als auch mit dem erwarteten Ort der DNA-Doppelstrangbrüche überein (Jakob *et al.* 2003; Rothkamm *et al.* 2003; Lobrich *et al.* 2006). Diese Methode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen ist sensitiv genug, um im mGy-Bereich DNA-Doppelstrangbrüche zu detektieren (Ward 1988; Rothkamm *et al.* 2003; Lobrich *et al.* 2006).

2. Ziel der Untersuchung

Ionisierende Strahlung kann zu einer Reihe von schädigenden Effekten beim Menschen führen, der wichtigste darunter ist die Induktion eines malignen Zellwachstums (Krebs). Diagnostische Verfahren in der Medizin bilden dabei, neben natürlicher Strahlung aus dem Weltraum oder von der Erde, mit einem Anteil von ungefähr 14 % den größten vom Menschen verursachten Anteil an ionisierender Strahlung (Mountford *et al.* 1992; Doll *et al.* 1997; Charles 2001; Gilbert 2001). DNA-Doppelstrangbrüche gehören dabei zu den bedeutendsten, der durch ionisierende Strahlung verursachten genetischen Schäden, die die Karzinogenese initiieren können (Dianov *et al.* 2001; Khanna *et al.* 2001; Jackson 2002; Burma *et al.* 2004). In einer kürzlich erschienenen Studie wurde die Verwendung von Röntgenstrahlen für diagnostische Zwecke in Deutschland für 1,5 % des kumulativen Krebsrisikos der Patienten bis zu einem Alter von 75 Jahren verantwortlich gemacht, was 2.049 Fällen pro Jahr entsprechen würde (Berrington de Gonzalez *et al.* 2004).

Die Korrelation des Krebsrisikos mit der Strahlungsdosis basiert allerdings bisher vor allem auf epidemiologischen Studien von Bevölkerungsgruppen, die außerordentlich intensiver Strahlung ausgesetzt waren – beispielsweise Überlebende des Atombombenabwurfes von Hiroshima und Nagasaki. Diese Studien haben zu relativ verlässlichen Schätzungen des Risikos bei mittleren bis hohen Dosen ionisierender Strahlung geführt (Mountford *et al.* 1992; Charles 2001). Die niedrigsten Dosen an Röntgenstrahlung, für die mit relativer Sicherheit von einem erhöhten Krebsrisiko ausgegangen werden kann, bewegen sich im Bereich von 10 bis 50 mGy (Brenner *et al.* 2003). Risikoabschätzungen unterhalb dieses Dosisbereichs sind nur bedingt aus epidemiologischen Daten zu extrahieren (Land 1980) und basieren, zumindest teilweise, auf linearen Extrapolationen aus existierenden Daten für hohe Strahlendosen (Berrington de Gonzalez *et al.* 2004; Brenner 2004; Brenner *et al.* 2004).

Eine bedeutende Quelle ionisierender Strahlung in der Medizin ist die interventionelle Radiologie, deren kumulative Dosis sich laut der RAD-IR Studie für verschiedene interventionsradiologische Maßnahmen im Bereich von durchschnittlich 1.284 mGy bei einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) bewegt (Miller *et al.* 2003; Miller *et al.* 2003; Balter *et al.* 2004). Bei der PTA wird im Allgemeinen eine Extremität über einen deutlich längeren Zeitraum (bis zu einer Stunde) ionisierender Strahlung ausgesetzt als bei konventionellen Röntgenaufnahmen oder während einer Computertomographie. Dies gibt

Anlass für diese therapeutischen Maßnahmen die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zu evaluieren.

Die Quantifizierung von umschriebenen Foci des am Serin 139 phosphorylierten Histons H2AX (γ -H2AX) mittels Immunfluoreszenzfärbung stellt eine relativ neue Methode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken ionisierender Strahlung dar. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Nachweisgrenze von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken von ionisierender Strahlung von einigen Gray auf einige mGray gesenkt werden (Jakob *et al.* 2003; Rothkamm *et al.* 2003).

Es wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass dieses Verfahren *in vivo* bei Lymphozyten anwendbar ist und der Verlust von γ -H2AX-Foci mit der Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche korreliert – so zeigen beispielsweise Individuen mit bekanntem DNA-Reparaturdefekt eine signifikant erhöhte Anzahl von γ -H2AX-Foci 24h post-Radiatio als eine Kontrollgruppe ohne DNA-Reparaturdefekt (Rothkamm *et al.* 2003; Lobrich *et al.* 2005; Rothkamm *et al.* 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte

1. die Immunfluoreszenzfärbung für γ -H2AX in unserem Labor etabliert werden,
2. die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer PTA der unteren Extremität quantifiziert werden,
3. eine Kinetik der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer PTA aufgestellt werden,
4. ein Vergleich der Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen zwischen der bestrahlten Extremität und dem systemischen Kreislauf und
5. ein Vergleich der Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen in Folge einer Computertomographie und in Folge einer PTA angestellt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
12-Bit CCD Monochromkamera	F-View II FW	Soft Imaging System GmbH, Münster
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Hanau
Computertomograph	Volume Zoom - 4-Zeilen MSCT	Siemens AG, Berlin
Dosimeter	FH 41 D3	Eberline Instruments GmbH, Erlangen
Dosimeter	Diados 11003-0178	PTW, Freiburg
DSA-Anlage	Multistar®	Siemens AG, Berlin
Durchleuchtungs-Anlage	Diagnost 73P	Royal Philips Electronics, Niederlande
Feinwaage	SBA 33	Scaltec, Heiligenstadt
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX61 mit U-RFL-T UV-Lampe	Olympus, Hamburg
Pipetten	Pipetman P2, P20, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Software	ImageJ	Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA,
Sterile Werkbank	Modell ET 130V/UV	Ehret, Emmerdingen
Sterile Werkbank	Typ. KS18	Herasafe, Kendro
Vortexer	Vortex-Genie 2	Bender & Hohbein, Zürich

Wasserbad	Thermomix BU	Braun, Melsungen
Wasserentionisierungsanlage	Milli Q UF plus	Millipore, Erkrath
Wippe	Eigenbau der Universitätswerkstatt	Werkstatt der medizinischen Forschungseinheiten, Marburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 2.0	Heraeus, Hanau

3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Typ	Hersteller, Ort
Aceton	Aceton	ACROS Organics, New Jersey, USA
Antibiotika	Streptomycin	GIBCO-BRL, Karlsruhe
Antibiotika	Penicillin G	GIBCO-BRL, Karlsruhe
Lymphozytentrennmedium	LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Methanol	100 %Methanol, technisch	ACROS Organics, New Jersey, USA
Mounting Medium	Fluorescent Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
Trypsin-Lösung	Trypsin-EDTA	GIBCO-BRL , Karlsruhe

Das verwendete Wasser entstammte in allen Fällen der MiliQ UF-Anlage (Fa. Millipore, Erkrath).

3.1.3 Medien und Waschlösungen

Medium	Typ	Hersteller, Ort
Fibroblastennährmedium	DMEM, Eagle	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Lymphozytennährmedium	RPMI 1640 with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PBS	Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Serum	Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

3.1.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Antikörper / Farbstoff	Typ	Hersteller, Ort
Primärer Antikörper	Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301 (mouse monoclonal IgG1)	Upstate, Lake Placid, USA
Sekundärer Antikörper	Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Fluorescein conjugate	Upstate, Lake Placid, USA
Zellkernfarbstoff	4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), Dye 33342	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

3.1.5 Blutentnahme

Material	Typ	Hersteller, Ort
Monovetten	S-Monovette Li-Hep-Gel, 4,9 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Venenpunktionsbesteck	Venofix	B. Braun AG, Melsungen

3.1.6 Eukaryote Zelllinien

- Fibroblasten: Menschliche Vorhautfibroblasten von der Firma Promocell (Heidelberg, Deutschland).

3.1.7 Sonstige Materialien

Material	Typ	Hersteller, Ort
6-Loch-Platten	TC-Plate 6-well	Greiner, Nürtingen
Deckgläser	20 x 20 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalpipetten	Einmalpipette 1 ml, steril	Falcon, Heidelberg
Eppendorfgefäß	Safe-Lock 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Kulturflaschen	Kulturflasche 25 cm ²	Greiner, Nürtingen
Kunststoffröhrchen	Cellstar PP-Tubes 15 ml	Greiner, Nürtingen
Objektträger	SuperFrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Menschliche Vorhautfibroblasten wurden in DMEM mit Zusatz 50 I.U./ml Penicillin-G, 50 µg/ml Streptomycin und 10 % FBS kultiviert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C aufbewahrt und mit 5 % CO₂ begast. Es erfolgte eine Passage pro Woche. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Experimente wurden durchgeführt als sich die Zellen in den Passagen 12 - 14 befanden. Etwa 24 h vor der Bestrahlung wurden die Fibroblasten mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² auf Deckgläsern (20 x 20 mm) in 6-Loch-Platten angesiedelt.

3.2.2 Bestimmung der Dosis

Die Bestrahlungsdosis wurde einmal mit einem Dosimeter Typ DIADOS verifiziert und anschließend mit einem Dosimeter vom Typ Eberline FH 41 D3 gemessen.

3.2.3 *In vitro*-Bestrahlung

Ca. 5 ml Blut aus einer Vene der Ellenbeuge wurden in Heparin-Monovetten entnommen und anschließend zusammen mit 5 ml, auf 37 °C vorgewärmtes RPMI-Medium mit 10 % FBS, in ein Kunststoffröhrchen gegeben. Fibroblasten wurden auf Deckgläsern in einer 6-Loch-Platte angesiedelt. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde die Probe mit der Philips Diagnost 73P-Anlage bei folgenden Einstellungen bestrahlt:

- 77 kV
- 10 mA
- 75 cm Abstand vom Austrittspunkt der Röntgenstrahlung zur Probe

Die Bestrahlungszeit wurde mit Hilfe der dosimetrischen Kontrolle so gewählt, bis die jeweilige Dosis erreicht war. Zehn Sekunden entsprachen bei diesen Einstellungen ungefähr einer Dosis von 10 mGy. Die Kontrolle wurde exakt gleich behandelt, verblieb aber während der Bestrahlung ausreichend abgeschirmt außerhalb des Raumes.

3.2.4 Computertomographie

Es wurden fünf Patienten ausgewählt, die die Einschlusskriterien erfüllten und keine Ausschlusskriterien aufwiesen. Bei allen Patienten war eine Computertomographie klinisch indiziert. Drei Patienten erhielten eine Computertomographie des Thorax, zwei Patienten eine Computertomographie des Thorax und des Abdomens. Die Computertomographie erfolgte mit einem Siemens Volume Zoom 4-Zeilen Mehrschicht Spiral-CT nach dem Standard-Protokoll des Institutes für Strahlendiagnostik der Philipps-Universität Marburg. In vier Fällen wurde als Kontrastmittel Imeron 300 (Altana Pharma, Konstanz) in einer Menge von 60 - 120 ml verwendet. Das Dosislängenprodukt (DLP) wurde direkt den Aufzeichnungen der Software des Computertomographen entnommen.

3.2.5 Perkutane transluminale Angioplastie

Es wurden zwanzig Patienten ausgewählt, die die Einschlusskriterien erfüllten und keine Ausschlusskriterien aufwiesen. Bei allen Patienten war eine perkutane transluminale Angioplastie der unteren Extremität klinisch indiziert. Die Indikation bildete die Notwendigkeit zur Therapie einer symptomatischen peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK). Die Durchleuchtung in digitaler Subtraktionstechnik erfolgte mit einer Siemens Multistar®-Anlage. Als Kontrastmittel wurden 50 - 120 ml Imeron 300 (Altana Pharma, Konstanz), Ultravist 300 (Schering AG, Berlin) oder Visipaque (GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK) verwendet. Das Dosisflächenprodukt (DFP) wurde direkt den Aufzeichnungen der Software der DSA-Anlage entnommen.

3.2.6 Dichtegradientenzentrifugation

Alle Proben wurden unmittelbar nach Entnahme weiterverarbeitet, die maximale Zeitverzögerung betrug ca. 25 min. Das entnommene Blut wurde 1:1 mit auf 37 °C vorgewärmtem RPMI-Medium mit 10 % FBS in ein Kunststoffröhrchen gegeben. Anschließend

wurden 6 ml Lymphozytentrennmedium in ein 15 ml Kunststoffröhrchen vorgegeben, darauf wurden mit Hilfe einer Kanüle vorsichtig 6 ml des Blut/RPMI-Gemisches geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.200 x g für 20 min und ausgeschalteter Bremse (Tripodi *et al.* 1971).

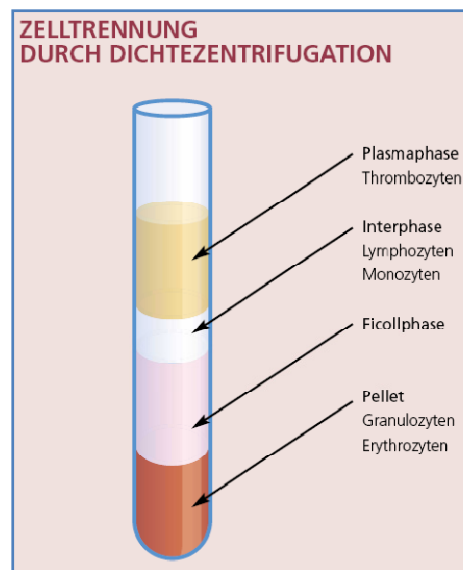


Abbildung 2-1: Schema der Dichtezentrifugation. Granulozyten und Erythrozyten setzen sich am Boden als Pellet ab, darüber befindet sich das Trennmedium in der Ficollphase. Durch die Interphase mit Lymphozyten und Monozyten getrennt, befindet sich darüber das Plasma, das die Thrombozyten enthält (Quelle: PAA Laboratories GmbH, Cölbe)

Anschließend wurde die Interphase mittels einer Pasteur-Pipette abgesaugt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Es folgten zwei Waschgänge mit 1x PBS, zuerst 10 min bei 300 x g und anschließend 10 min bei 250 x g. Der Überstand wurde bis auf den Niederschlag abgenommen und dieser wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Zur Doppelbestimmung wurden je 100 µl auf zwei 20 x 20 mm große Deckgläser getropft und 10 min an der Luft getrocknet.

3.2.7 Fixierung

Die Deckgläser wurden in 6-Loch-Platten gelegt. Zur Fixierung wurden die Fibroblasten oder Lymphozyten zuerst für 30 min bei - 20 °C mit 3 ml 100 % Methanol pro Deckglas versetzt und anschließend zur Membranpermeabilisierung für 1 min bei - 20 °C mit 3 ml Aceton pro Deckglas.

3.2.8 Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurden die Zellen bei Raumtemperatur 3 x 10 min in PBS mit 1 % FBS gewaschen. Anschließend wurden je Probe 40 µl des 1:200 in PBS verdünnten, primären Antikörpers (Anti-phospho-Histon H2A.X) in die Mitte des Deckglases gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Morgen wurden die Zellen bei Raumtemperatur 3 x 10 min in PBS mit 1 % FBS gewaschen. Anschließend wurden je Probe 80 µl des 1:400 in PBS verdünnten, sekundären Antikörpers (Anti-Maus IgG, Fluoreszein-Konjugat) in die Mitte des Deckglases gegeben und die Proben wurden 1 h bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut bei Raumtemperatur 3 x 10 min in PBS gewaschen. Zur Zellkernfärbung wurden 40 µl 1:2.000 in PBS verdünntes 4,6-Diamidino-2-phenylindol für 5 min auf die Zellen gegeben. Es folgten zwei abschließende Waschgänge von je 5 min mit PBS bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden nun mit Fluorescent Mounting Medium auf SuperFrost Plus-Objektträgern eingedeckelt und mindestens 4 h im Kühlschrank getrocknet.

3.2.9 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem Olympus BX61-Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des 100x-Objektivs. Es wurden hierbei folgende Filter verwendet:

Filtername	Filter verwendet für folgende Färbungen	Anregung in nm	Emission in nm
DAPI	DAPI	330 - 385	345 - 455
FITC	Fluoreszein	470 - 490	494 - 518

Für jeden Zeitschritt wurden zwei Bereiche auf zwei separaten Deckgläsern mit jeweils mindestens 40 Zellen und 40 Foci ausgewertet. Granulozyten und Monozyten wurden anhand morphologischer Kriterien identifiziert und nicht in die Auswertung mit einbezogen.

3.2.10 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurden zunächst der statistische Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) aus den einzelnen Zählungen jedes Zeitschrittes berechnet. Zur Korrelation zwischen der Dosis und dem Focianstieg wurde der Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson (r) herangezogen. Ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und eine Analyse der statistischen Power wurde zur Prüfung der Signifikanz der unvollständigen Reparatur der Doppelstrangbrüche 24 h nach PTA durchgeführt. Für den Fehler 1. Art wurde $P < 0,05$ als signifikant angesehen, bei der statistischen Power wurde eine Teststärke (1- β) von 80 % als ausreichend angesehen (Cohen 1988). GNU R (Version 2.6.1, The R Foundation for Statistical Computing) wurde zur Berechnung aller statistischen Tests verwendet.

3.3 Patientenuntersuchung

3.3.1 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll wurde der Kommission für Ethik in der ärztlichen Forschung des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Begutachtung vorgelegt. Die Kommission stimmte dem Protokoll am 22.02.2006 zu.

3.3.2 Einverständnis

Alle Patienten wurden vor der Untersuchung über die Studie aufgeklärt. Nach ausführlicher Aufklärung wurden die Patienten aufgenommen, falls sie ihr schriftliches Einverständnis gegeben hatten. Zusätzlich erfolgte eine Aufklärung und eine schriftliche Einverständniserklärung zur Computertomographie und perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA). Die Aufklärung zur Studie erfolgte mindestens 24 Stunden vor der CT oder PTA.

3.3.3 Patientenkollektiv

Es wurden 5 Patienten (3 männlich, 2 weiblich) nach einer CT-Untersuchung und 20 Patienten (14 männlich, 6 weiblich) nach einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) der unteren Extremität untersucht. Das mittlere Alter der CT-Patienten betrug 64,6 Jahre, das der PTA-Patienten 68,5 Jahre.

3.3.4 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Ein- und Ausschlusskriterien waren folgendermaßen festgelegt worden:

Einschlusskriterien:

- Indikation zur perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) der unteren Extremität, in der Regel zur Therapie einer symptomatischen peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK)
- Indikation zur Computertomographie des Thorax und/oder Abdomens (Kontrollgruppe)

Ausschlusskriterien:

- Z.n. oder aktuelle Leukämie oder Lymphom
- Strahlentherapie innerhalb der letzten 6 Monate
- Röntgenuntersuchung oder Szintigraphie innerhalb der letzten 3 Tage
- Alter < 18 Jahre

3.3.5 Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde in allen Fällen aus einer oberflächlichen Vene der oberen Extremität mittels eines Venofix-Venenpunktionsbestecks oder aus einem bereits vorhandenen peripheren Venenzugang vorgenommen. Es wurden jeweils ca. 5 ml Blut pro Zeitschritt entnommen.

Bei drei PTA-Patienten wurde zusätzlich Blut aus der Leistenvene entnommen. Hierfür wurden über einen unter Ultraschallsteuerung eingebrachten Katheter aus der Vena femoralis jeweils ca. 5 ml Blut entnommen.

Die Blutentnahme erfolgte in Monovetten mit Lithium-Heparin-Gel.

3.3.6 Zeitplan der Untersuchungen

Bei den CT-Patienten wurde zu folgenden Zeitpunkten Blut entnommen:

- Unmittelbar vor der Untersuchung
- 5 min nach der Untersuchung
- 1 h nach der Untersuchung
- 6 h nach der Untersuchung
- 24 h nach der Untersuchung

Bei den PTA-Patienten mit ausschließlich peripherer Blutentnahme wurde zu folgenden Zeitpunkten Blut entnommen:

- Unmittelbar vor der ersten Röntgenstrahlenexposition
- 5 min nach der letzten Röntgenstrahlenexposition
- 1 h nach Ende der Untersuchung
- 6 h nach Ende der Untersuchung
- 24 h nach Ende der Untersuchung

Bei den PTA-Patienten mit peripherer Blutentnahme und Blutentnahme aus der V. femoralis wurde zu folgenden Zeitpunkten Blut entnommen:

- Aus einer peripheren Vene:
 - Unmittelbar vor der ersten Röntgenstrahlenexposition
 - 5 min nach der letzten Röntgenstrahlenexposition
 - 1 h nach Ende der Untersuchung
 - 6 h nach Ende der Untersuchung
 - 24 h nach Ende der Untersuchung
- Aus der V. femoralis der behandelten Seite:
 - Unmittelbar vor der ersten Röntgenstrahlenexposition
 - 5 min nach der ersten Röntgenstrahlenexposition
 - 10 min der ersten Röntgenstrahlenexposition
 - 5 min nach der letzten Röntgenstrahlenexposition

4. Ergebnisse

4.1 γ -H2AX-Foci nach in-vitro Bestrahlung von humanen Fibroblasten proportional zur Bestrahlungsdosis

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen die Darstellung von γ -H2AX-Foci durch Immunfluoreszenz verwendet.

Im Rahmen der Etablierung dieser Methode in unserem Labor wurde zunächst die durchschnittliche Anzahl von γ -H2AX-Foci nach Einwirkung von 20 und 200 mGy γ -Strahlung auf humane Vorhaut-Fibroblasten bestimmt. Dazu wurde die Zahl der induzierten γ -H2AX-Foci 30 min nach Bestrahlung durch eine Philips Diagnost Röntgen-Anlage ausgezählt. Hierbei ergab sich eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung, der Korrelationskoeffizient zwischen Dosis und Focizunahme nach Bravais-Pearson (r) betrug 0,999. Durchschnittlich wurden hochgerechnet pro 1 Gy applizierter Röntgenstrahlung $36,04 \pm 2,15$ (Mittelwert \pm SEM) γ -H2AX-Foci induziert.

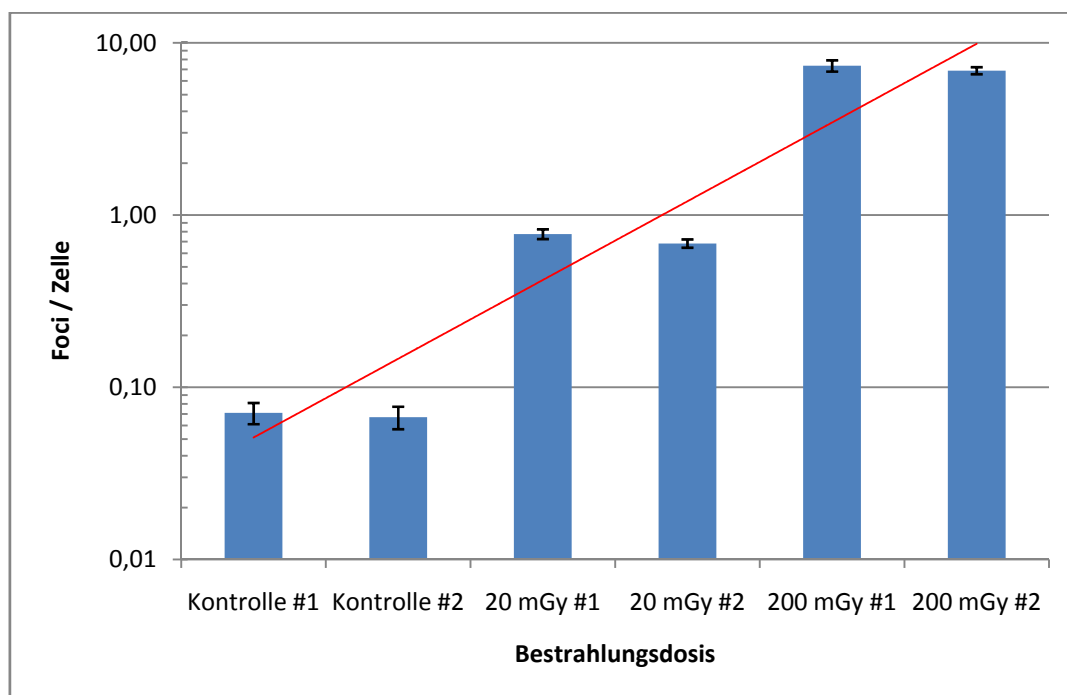


Abbildung 4-1: γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Vorhaut-Fibroblasten in zwei unterschiedlichen Experimenten. Jeder Balken ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Zählungen \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

4.2 γ -H2AX-Foci nach in-vitro Bestrahlung von humanen Lymphozyten proportional zur Bestrahlungsdosis

Zur weiteren Näherung an die Fragestellung wurde die durchschnittliche Anzahl von γ -H2AX-Foci nach Einwirkung von 20 und 200 mGy γ -Strahlung auf humane Lymphozyten bestimmt. Dazu wurde die Zahl der induzierten γ -H2AX-Foci 30 min nach Bestrahlung durch eine Philips Diagnost Röntgen-Anlage ausgezählt. Auch hierbei ergab sich eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung, der Korrelationskoeffizient zwischen Dosis und Focizunahme nach Bravais-Pearson (r) betrug 0,998. Durchschnittlich wurden hochgerechnet pro 1 Gy applizierter Röntgenstrahlung $29,59 \pm 2,22$ (Mittelwert \pm SEM) γ -H2AX-Foci induziert.

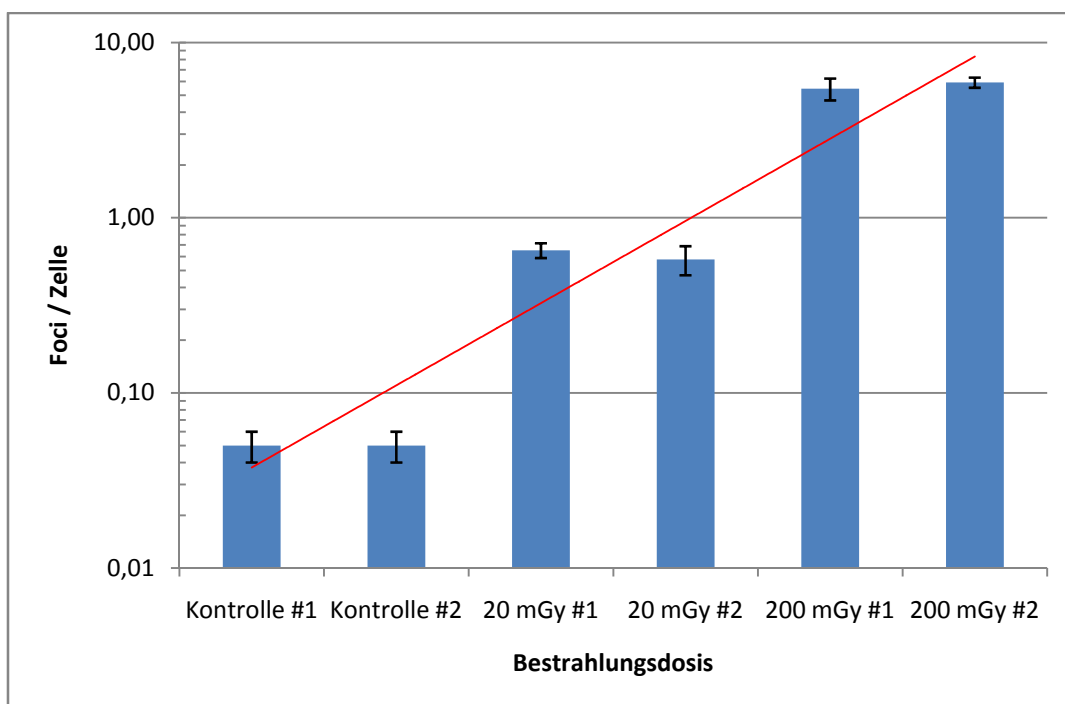


Abbildung 4-2: γ -H2AX-Foci pro Zelle nach applizierter Röntgenstrahlung in humanen Lymphozyten in zwei unterschiedlichen Experimenten. Jeder Balken ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Zählungen \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

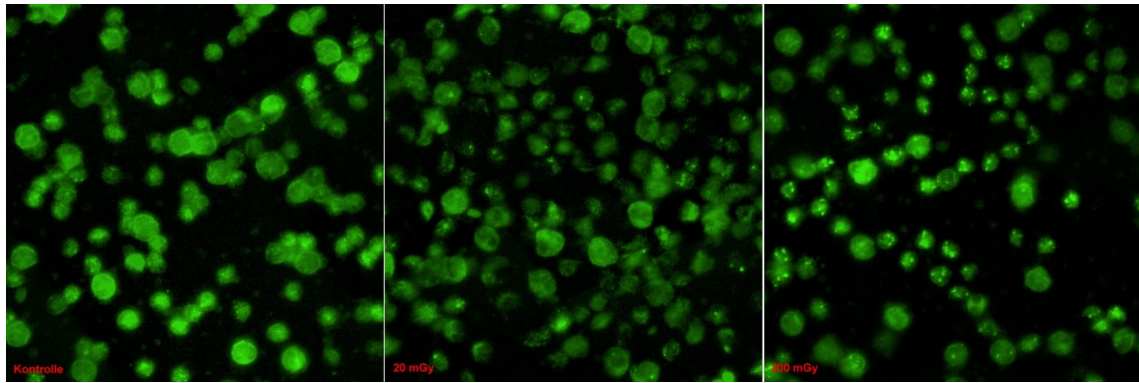


Abbildung 4-3: Lymphozyten mit Anti- γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung ohne Bestrahlung, nach in-vitro Bestrahlung mit 20 mGy und nach in-vitro Bestrahlung mit 200 mGy (Vergrößerung 400x).

4.3 γ -H2AX-Foci nach Computertomographie

Bei 5 Patienten wurde die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle zu folgenden Zeitpunkten bestimmt: unmittelbar vor der Untersuchung, 5 min nach der Untersuchung sowie 1 h, 6 h und 24 h nach der Untersuchung. Drei Patienten erhielten ein Thorax-CT, zwei Patienten ein CT des Thorax und des Abdomens. Die Untersuchungen führten zu einem Dosislängenprodukt (DLP) zwischen 230 und 856 mGy·cm.

Patient	DLP (mGy·cm)	Ø Foci prä CT	Ø Foci 5 min post CT	Ø Foci 1 h post CT	Ø Foci 6 h post CT	Ø Foci 24 h post CT
1	230	0,064 ± 0,005	0,117 ± 0,004	0,097 ± 0,008	0,070 ± 0,002	0,074 ± 0,006
2	228	0,062 ± 0,013	0,108 ± 0,007	0,087 ± 0,006	0,075 ± 0,005	0,052 ± 0,011
3	273	0,053 ± 0,006	0,120 ± 0,002	0,066 ± 0,006	0,081 ± 0,006	0,057 ± 0,017
4	585	0,072 ± 0,008	0,304 ± 0,009	0,202 ± 0,014	0,137 ± 0,004	0,067 ± 0,014
5	856	0,066 ± 0,009	0,436 ± 0,007	0,338 ± 0,009	0,225 ± 0,011	0,084 ± 0,007

Tabellarische Ergebnisübersicht nach Computertomographie. Jeder Messwert ist der Mittelwert der unabhängigen Zählung aus zwei Präparaten ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

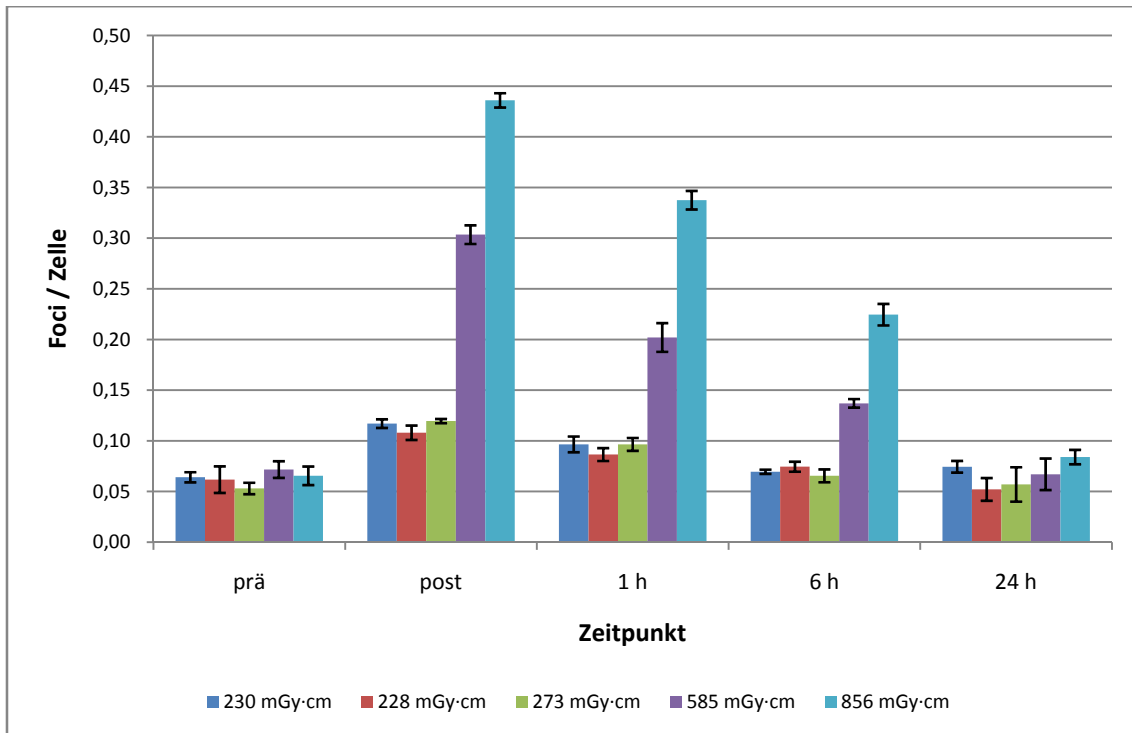


Abbildung 4-4: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach Computertomographie in humanen Lymphozyten. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus zwei Präparaten mit je zwei unabhängigen Zählungen \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle stieg in der Blutprobe 5 min nach der Untersuchung (durchschnittlich $0,217 \pm 0,147$ Foci pro Zelle) im Vergleich zur Blutprobe unmittelbar vor der Untersuchung (durchschnittlich $0,063 \pm 0,007$ Foci pro Zelle) gemittelt über alle 5 Patienten um den Faktor 3,3 an (min. 1,8; max. 6,7).

Die Zunahme der γ -H2AX-Foci pro Zelle in der Blutprobe 5 min nach der Untersuchung im Vergleich zur Blutprobe unmittelbar vor der Untersuchung betrug hochgerechnet pro 1.000 mGy-cm DLP durchschnittlich $7,78 \pm 0,37$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes).

Das durchschnittliche Verhältnis der γ -H2AX-Foci pro Zelle 24 h nach der Untersuchung im Vergleich zu unmittelbar vor der Untersuchung entspricht einem Niveau von $106 \% \pm 18 \%$ des Ausgangswertes. Der Mittelwert der Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle 24 h nach der Untersuchung war $0,067 \pm 0,013$, im Vergleich zu einem Wert von $0,063 \pm 0,007$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes) unmittelbar vor der Untersuchung. 1 h nach der Untersuchung bestanden durchschnittlich noch $77 \% \pm 6 \%$ der Doppelstrangbrüche zum Zeitpunkt 5 min nach der Untersuchung, 6 h nach der Untersuchung noch $56 \% \pm 9 \%$.

4.4 γ -H2AX-Foci nach perkutaner transluminaler Angioplastie

Bei 20 Patienten wurde die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle bei perkutaner transluminale Angioplastie zu folgenden Zeitpunkten bestimmt: Unmittelbar vor der ersten Röntgenstrahlenexposition, 5 min nach der letzten Röntgenstrahlenexposition, sowie 1 h, 6 h und 24 h nach der Untersuchung. Alle Patienten erhielten eine perkutane transluminale Angioplastie der unteren Extremität in unterschiedlichem Ausmaß, die Behandlungen unterschieden sich dabei sowohl in der Dauer der Behandlung, der kumulativen Durchleuchtungszeit und der Anzahl der Röntgenaufnahmen. Das Dosisflächenprodukt (DFP) variierte zwischen 6,31 und 30,36 Gy·cm².

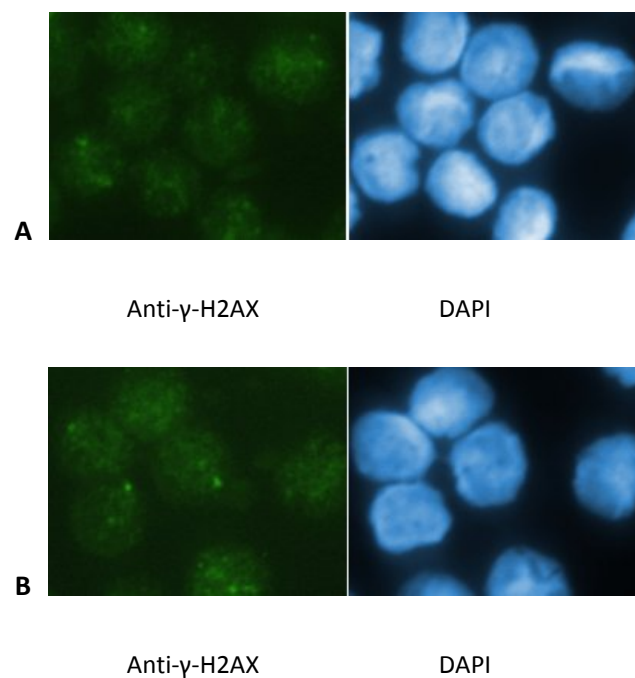


Abbildung 4-5: Lymphozyten mit Anti- γ -H2AX-Immunfluoreszenzfärbung und DAPI-Färbung unmittelbar vor (A) und 5 min nach PTA. Vergrößerung 600x.

Patient	DFP (Gy·cm ²)	Ø Foci prä PTA	Ø Foci 5 min post PTA	Ø Foci 1 h post PTA	Ø Foci 6 h post PTA	Ø Foci 24 h post PTA
1	10,45	0,023 ± 0,005	0,158 ± 0,007	0,117 ± 0,006	0,081 ± 0,004	0,034 ± 0,004
2	27,59	0,062 ± 0,020	1,094 ± 0,043	0,682 ± 0,016	0,472 ± 0,022	0,109 ± 0,006
3	16,41	0,057 ± 0,007	0,542 ± 0,027	0,381 ± 0,009	0,258 ± 0,006	0,061 ± 0,004
4	6,65	0,056 ± 0,002	0,230 ± 0,002	0,164 ± 0,021	0,119 ± 0,004	0,063 ± 0,001
5	12,26	0,039 ± 0,005	0,279 ± 0,010	0,214 ± 0,004	0,141 ± 0,010	0,045 ± 0,006
6	6,78	0,030 ± 0,004	0,136 ± 0,005	0,103 ± 0,007	0,078 ± 0,004	0,033 ± 0,002
7	7,94	0,045 ± 0,005	0,199 ± 0,003	0,149 ± 0,005	0,103 ± 0,009	0,053 ± 0,003
8	7,61	0,067 ± 0,010	0,316 ± 0,013	0,231 ± 0,011	0,150 ± 0,012	0,097 ± 0,009
9	20,78	0,052 ± 0,002	0,685 ± 0,031	0,501 ± 0,014	0,354 ± 0,001	0,077 ± 0,013
10	7,68	0,032 ± 0,001	0,168 ± 0,004	0,120 ± 0,006	0,097 ± 0,008	0,085 ± 0,010
11	20,26	0,044 ± 0,003	0,633 ± 0,029	0,489 ± 0,008	0,325 ± 0,008	0,062 ± 0,008
12	30,36	0,045 ± 0,005	0,927 ± 0,025	0,686 ± 0,012	0,485 ± 0,010	0,065 ± 0,004
13	6,31	0,028 ± 0,005	0,132 ± 0,015	0,092 ± 0,001	0,081 ± 0,004	0,049 ± 0,006
14	18,27	0,048 ± 0,003	0,599 ± 0,022	0,461 ± 0,014	0,301 ± 0,016	0,064 ± 0,001
15	9,08	0,041 ± 0,005	0,242 ± 0,004	0,179 ± 0,006	0,126 ± 0,004	0,055 ± 0,005
16	6,96	0,036 ± 0,004	0,160 ± 0,017	0,109 ± 0,005	0,091 ± 0,003	0,048 ± 0,002
17	8,96	0,044 ± 0,004	0,261 ± 0,004	0,186 ± 0,004	0,137 ± 0,005	0,065 ± 0,004
18	14,47	0,051 ± 0,006	0,499 ± 0,017	0,390 ± 0,008	0,254 ± 0,014	0,092 ± 0,008
19	21,37	0,039 ± 0,005	0,578 ± 0,007	0,456 ± 0,007	0,304 ± 0,008	0,076 ± 0,001
20	14,87	0,052 ± 0,001	0,529 ± 0,013	0,359 ± 0,010	0,253 ± 0,013	0,079 ± 0,006

Tabellarische Ergebnisübersicht nach PTA. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus zwei Präparaten mit je zwei unabhängigen Zählungen ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

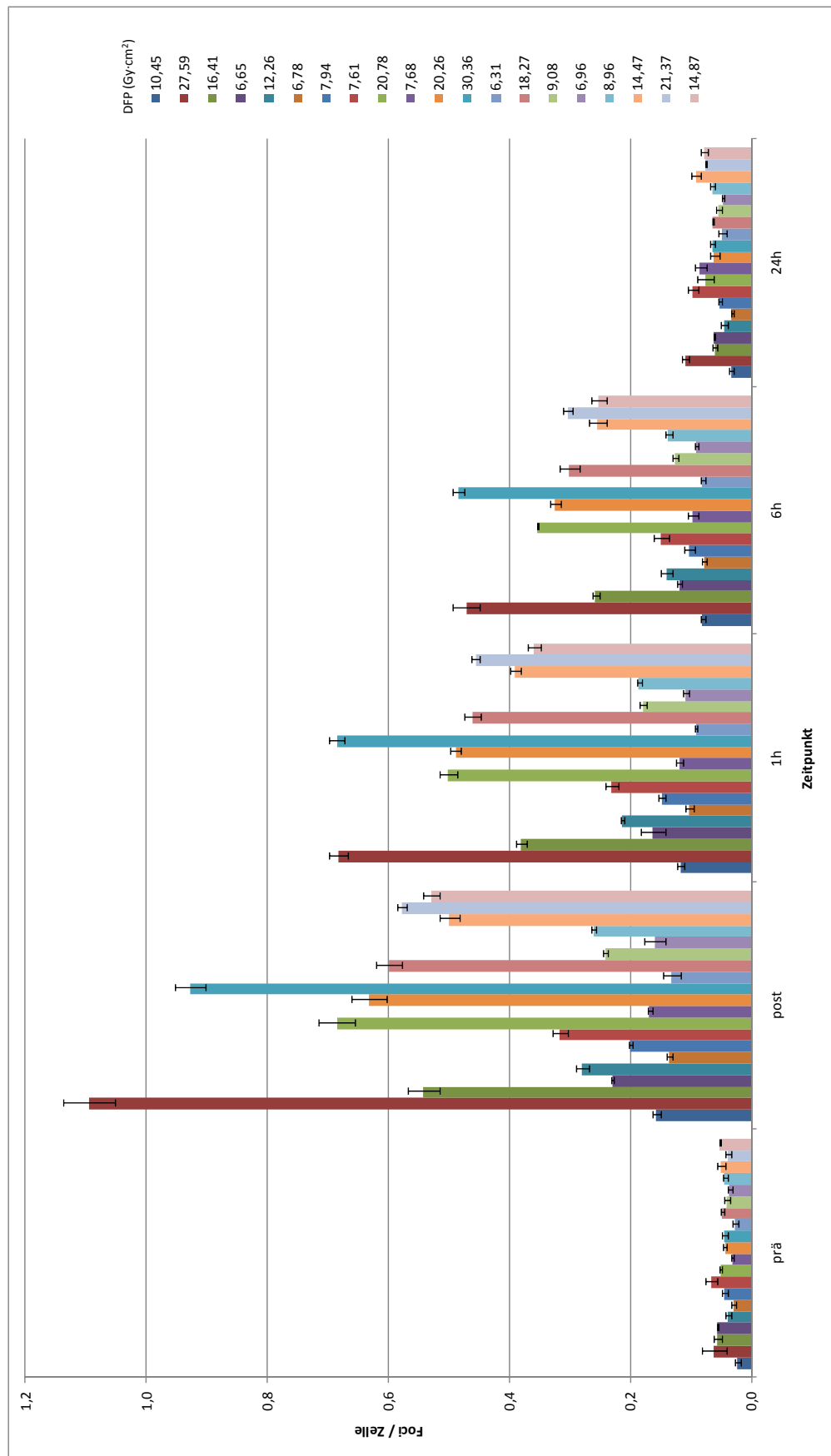


Abbildung 4-6: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach PTA in humanen Lymphozyten. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert aus zwei Präparaten mit je zwei unabhängigen Zählungen \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle stieg in der Blutprobe 5 min nach der Untersuchung (durchschnittlich $0,418 \pm 0,277$ Foci pro Zelle) im Vergleich zur Blutprobe unmittelbar vor der Untersuchung (durchschnittlich $0,044 \pm 0,012$ Foci pro Zelle) gemittelt über alle 20 Patienten um den Faktor 9,08 an (min. 4,08; max. 20,67).

Die Dosiszunahme in der Blutprobe 5 min nach der letzten Röntgenstrahlenexposition im Vergleich zur Blutprobe unmittelbar vor der ersten Röntgenstrahlenexposition betrug hochgerechnet pro $10 \text{ Gy} \cdot \text{cm}^2$ Dosisflächenprodukt durchschnittlich $6,56 \pm 0,48$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes).

Das durchschnittliche Verhältnis der γ -H2AX-Foci pro Zelle 2 h nach der Untersuchung im Vergleich zu unmittelbar vor der Untersuchung entspricht einem Niveau von $149 \% \pm 37 \%$ des Ausgangswertes. Der Mittelwert der Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle 24 h nach der Untersuchung war $0,065 \pm 0,020$, im Vergleich zu einem Wert von $0,044 \pm 0,012$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes) unmittelbar vor der Untersuchung. 1 h nach der Untersuchung bestanden durchschnittlich noch $73 \% \pm 4 \%$ der Doppelstrangbrüche zum Zeitpunkt 5 min nach der Untersuchung, 6 h nach der Untersuchung noch $52 \% \pm 4 \%$.

4.4.1 Zusätzliche selektive Blutentnahme aus der bestrahlten Extremität

Bei drei Patienten wurde zusätzlich die Anzahl der γ -H2AX-Foci in Lymphozyten bestimmt, die direkt aus dem Blutabfluss der bestrahlten Extremität entnommen wurden.

	DFP ($\text{Gy} \cdot \text{cm}^2$)	\emptyset Foci prä PTA	\emptyset Foci 5 min PTA- Dauer	\emptyset Foci 10 min PTA- Dauer	\emptyset Foci 5 min post PTA	\emptyset Foci 1 h post PTA	\emptyset Foci 6 h post PTA	\emptyset Foci 24 h post PTA
P1: peripher	10,45	$0,023 \pm 0,005$	-	-	$0,158 \pm 0,007$	$0,117 \pm 0,006$	$0,081 \pm 0,004$	$0,034 \pm 0,004$
P1: V. femoralis		$0,025 \pm 0,002$	$0,077 \pm 0,006$	$0,169 \pm 0,003$	$0,268 \pm 0,006$	-	-	-
P2: peripher	21,37	$0,039 \pm 0,005$	-	-	$0,578 \pm 0,007$	$0,456 \pm 0,007$	$0,304 \pm 0,008$	$0,076 \pm 0,006$
P2: V. femoralis		$0,041 \pm 0,004$	$0,268 \pm 0,033$	$0,464 \pm 0,011$	$0,773 \pm 0,017$	-	-	-
P3: peripher	14,87	$0,052 \pm 0,001$	-	-	$0,529 \pm 0,013$	$0,359 \pm 0,010$	$0,253 \pm 0,013$	$0,079 \pm 0,006$
P3: V. femoralis		$0,047 \pm 0,001$	$0,184 \pm 0,008$	$0,430 \pm 0,001$	$0,710 \pm 0,021$	-	-	-

Tabellarische Ergebnisübersicht nach Blutentnahme aus bestrahlter Extremität nach PTA. Jeder Messwert ist der Mittelwert aus zwei Präparaten mit je zwei unabhängigen Zählungen \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Die durchschnittliche Anzahl an γ -H2AX-Foci pro Zelle lag 5 min nach PTA-Ende in den Lymphozyten direkt aus der bestrahlten Extremität im Vergleich zu den Lymphozyten aus dem systemischen Kreislauf um den Faktor $1,46 \pm 0,20$ höher.

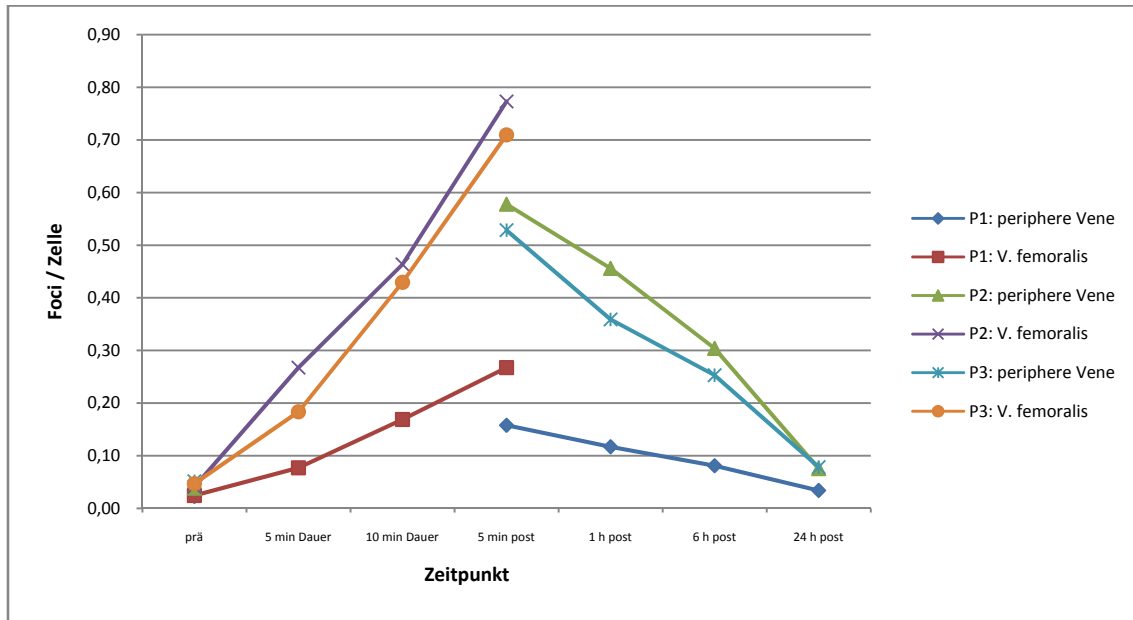


Abbildung 4-6: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach PTA in Lymphozyten aus der bestrahlten Extremität und Lymphozyten aus dem systemischen Kreislauf im Vergleich. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus zwei Präparaten mit je zwei unabhängigen Zählungen \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

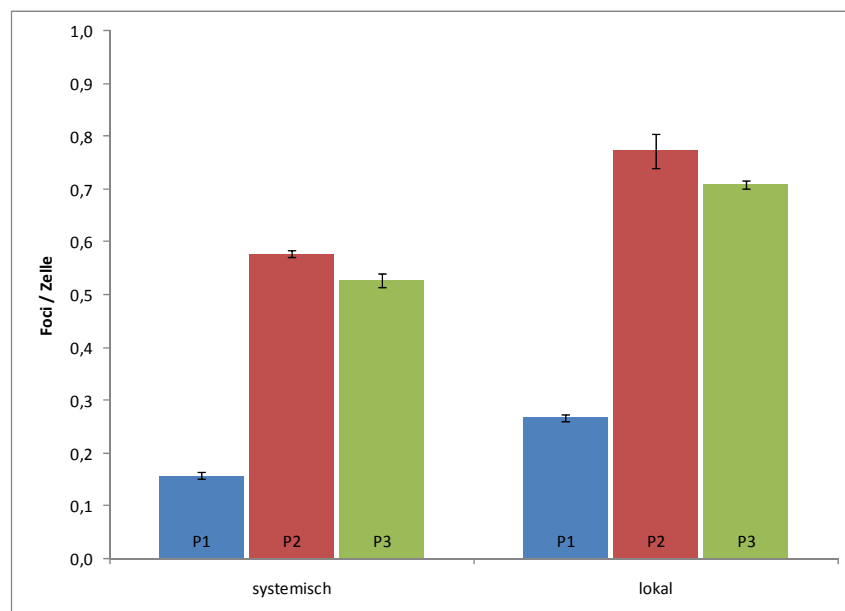


Abbildung 4-7: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle 5 min nach PTA in Lymphozyten aus der bestrahlten Extremität und Lymphozyten aus dem systemischen Kreislauf im Vergleich. Jeder Balken ist der Mittelwert aus den Werten der drei Patienten \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM). P1 - P3: Patient 1 bis 3.

5. Diskussion

5.1 Quantifizierung der durch ionisierende Strahlung in Fibroblasten und Lymphozyten verursachten DNA-Doppelstrangbrüche

Bei Versuchen zur *in vitro*-Bestrahlung primärer humaner Fibroblasten konnte im Rahmen der Etablierung der Methode zur Bestimmung von γ -H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenz im eigenen Labor gezeigt werden, dass es eine lineare Abhängigkeit zwischen der Anzahl an γ -H2AX-Foci und der applizierten Dosis an Röntgenstrahlung gibt. Durchschnittlich wurden hochgerechnet pro 1 Gy applizierter Röntgenstrahlung $36,04 \pm 2,15$ (Mittelwert \pm SEM) γ -H2AX-Foci pro Zelle induziert. Rothkamm *et al.* kommen 2003 zu einem Wert von 35 - 39 γ -H2AX-Foci pro Zelle in MRC-5-Fibroblasten für Dosen zwischen 0,2 mGy und 2 Gy (Rothkamm *et al.* 2003).

Es ist bekannt, dass γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung mit Proteinen kolokalisiert sind, die an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind (Paull *et al.* 2000). In Versuchen zur gezielten Erzeugung von DNA-Doppelstrangbrüchen konnte gezeigt werden, dass sich die γ -H2AX-Foci an diesen Doppelstrangbrüchen bilden, z.B. mit in zelluläre DNA eingebauten ^{125}I -Nukliden (Sedelnikova *et al.* 2002) oder durch Bestrahlung mit Schwerionen (Jakob *et al.* 2003). Es kann daher als evident betrachtet werden, dass die Quantifizierung von γ -H2AX-Foci eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken von ionisierender Strahlung darstellt (Jakob *et al.* 2003; Pilch *et al.* 2003; Fernandez-Capetillo *et al.* 2004).

In Versuchen mit humanen Lymphozyten wurden hochgerechnet pro 1 Gy applizierter Röntgenstrahlung $29,59 \pm 2,22$ (Mittelwert \pm SEM) γ -H2AX-Foci induziert, dies sind 17,9 % weniger als bei Versuchen mit primären humanen Fibroblasten. Hier wurde ebenfalls eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung gefunden. Rothkamm *et al.* publizierten 2007 einen Wert von 29,3 γ -H2AX-Foci pro Zelle in Lymphozyten (Rothkamm *et al.* 2007). Auch bei diesem Zelltyp kann davon ausgegangen werden, dass die Methode sensitiv und akkurat DNA-Doppelstrangbrüche nachweist.

5.2 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch γ -H2AX-Foci nach Computertomographie

Bei 5 Patienten wurde die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle im zeitlichen Verlauf nach einer Computertomographie untersucht. Drei Patienten erhielten ein Thorax-CT, zwei Patienten ein CT des Thorax und des Abdomens. Die Untersuchungen resultierten in einem Dosislängenprodukt (DLP) zwischen 230 und 856 mGy·cm.

Die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle stieg in der Blutprobe 5 min nach der Untersuchung im Vergleich zur Blutprobe unmittelbar vor der Untersuchung gemittelt über alle 5 Patienten um den Faktor 3,3 an (min. 1,8; max. 6,7).

Die Dosiszunahme in der Blutprobe 5 min nach der Untersuchung im Vergleich zur Blutprobe unmittelbar vor der Untersuchung betrug hochgerechnet pro 1.000 mGy·cm durchschnittlich $7,78 \pm 0,37$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes). Es lässt sich folgende Näherungsformel zur Abschätzung der Proportionalität von Dosiszunahme und DLP aufstellen:

$$\frac{\frac{\emptyset \text{ Foci pro Zelle 5 min post CT}}{\emptyset \text{ Foci pro Zelle prä CT}}}{DLP \cdot 100}$$

Es ergibt sich für die 5 Patienten ein Bereich von 0,72 bis 0,83 (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes: $0,78 \pm 0,04$). Des Weiteren betrug der Korrelationskoeffizient zwischen DLP und Focizunahme nach Bravais-Pearson (r) 0,997. Somit kann von einer direkten Proportionalität ausgegangen werden. Im Vergleich mit ähnlichen Studien liegen diese Ergebnisse im erwarteten Rahmen. Beispielsweise kommen Rothkamm *et al.* 2007 zu einer Erhöhung der Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle um den Faktor 8 - 10 bei einer Gruppe aus 13 Patienten mit Thorax oder Thorax-Abdomen-CT (Rothkamm *et al.* 2007).

Ab der Blutentnahme zum Zeitpunkt 1 h nach der Untersuchung nahm die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle wieder ab, um zum Zeitpunkt 24 h nach der Untersuchung wieder den Bereich der Ausgangswerte zu erreichen. Das durchschnittliche Verhältnis der γ -H2AX-Foci pro Zelle 24 h nach der Untersuchung im Vergleich zu unmittelbar vor der Untersuchung entspricht einem Niveau von $106 \% \pm 18 \%$ des Ausgangswertes. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zwischen der Foci-Anzahl vor der Untersuchung und 24 h nach der Untersuchung ergab keinen signifikanten Unterschied ($P = 0,1203$). Es kann hier also von einer vollständigen Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche *in vivo* 24 h nach der Computertomographie gesprochen werden, dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Lobrich *et al.* 2005; Rothkamm *et al.* 2007). Die Kinetik der Abnahme der Foci

war bei allen 5 Patienten vergleichbar: 1 h nach der Untersuchung bestanden durchschnittlich noch $77 \% \pm 6 \%$ der Doppelstrangbrüche zum Zeitpunkt 5 min nach der Untersuchung, 6 h nach der Untersuchung noch $56 \% \pm 9 \%$.

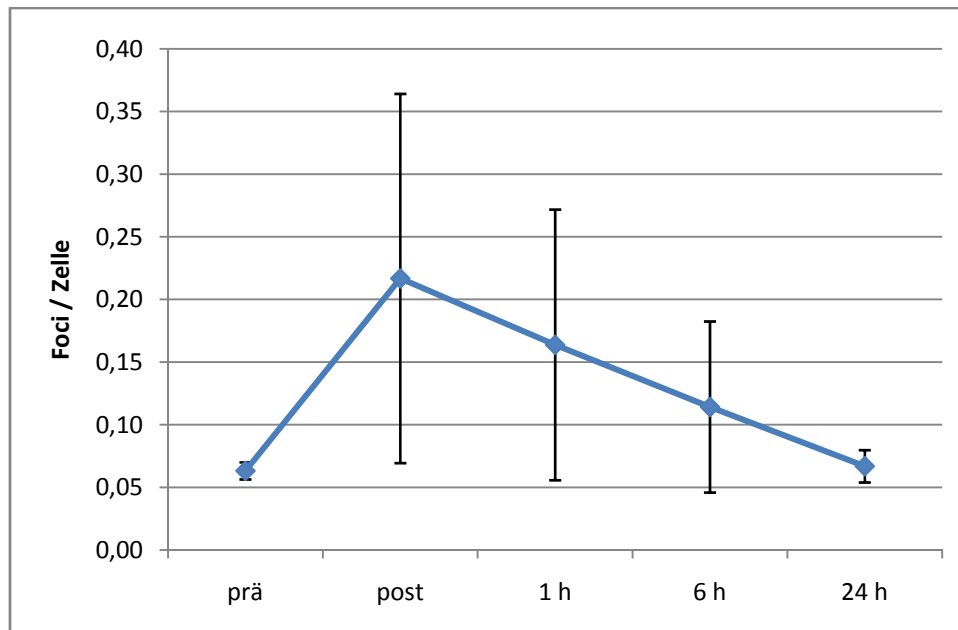


Abbildung 5-1: Kinetik der γ -H2AX-Foci pro Zelle nach Computertomographie in humanen Lymphozyten. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus den jeweiligen Daten der 5 Patienten \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dar.

Zusammenfassend betrachtet lässt sich die Hypothese, dass die Quantifizierung von γ -H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenz ein geeignetes und sehr sensibles Verfahren zur *in vivo*-Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Computertomographie ist, bestätigen. Die Zahl der DNA-Doppelstrangbrüche korreliert linear mit dem Dosislängenprodukt, nach 24 h findet sich eine vollständige Reparatur, so dass das Hintergrundniveau wieder erreicht wird.

5.3 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch γ -H2AX-Foci nach perkutaner transluminaler Angioplastie

Interventionelle Verfahren unter Röntgenkontrolle unterscheiden sich durch eine Vielzahl von Faktoren von anderen radiologischen Verfahren. Der Patient ist bei einer PTA beispielsweise über einen deutlich längeren Zeitraum ionisierender Strahlung ausgesetzt, als bei konventionellen Röntgenaufnahmen oder während einer Computertomographie. Moderne Durchleuchtungsgeräte arbeiten zwar in einem gepulsten Betrieb, d.h. es besteht keine kontinuierliche Röntgenstrahlenexposition sondern es werden nur einige, wenige Millisekunden dauernde, Impulse pro Sekunde abgegeben, dennoch besteht eine Exposition

des Patienten über einen deutlich längeren Zeitraum als bei allen anderen vergleichbaren Röntgenuntersuchungen. Bisherige Näherungen an die Frage nach den Auswirkungen dieser Art der Strahlenexposition waren z.B. Monte Carlo-Berechnungen eines Konversionskoeffizienten zwischen Dosisflächenprodukt und effektiver Dosis mittels Phantomdosimetrie oder eine Bestimmung der Oberflächendosis (Le Heron 1992; Chida *et al.* 2006; Chu *et al.* 2006; D'Ercole *et al.* 2007). Le Heron publizierte 1992 einen Konversionskoeffizienten von 0,17 mSv pro Gy·cm² für eine Angiographie der Hüfte. Dies würde einer effektiven Dosis von 1,7 mSv bei einem DFP von 1 Gy·cm² entsprechen. Die Analyse chromosomaler Veränderungen auf konventionell-lichtmikroskopischer Art ist wegen der relativ geringen Induktion von sichtbaren Aberrationen bei niedrigen Dosen ionisierender Strahlung auf Dosen von über 100 mGy beschränkt (Bauchinger 1995). Alle dosimetrischen Verfahren haben gemeinsam, dass sie ausschließlich auf einer Messung des „Auslösers“ basieren - keines der bisherigen Verfahren ermöglicht die Registrierung der Strahlenwirkung im molekularbiologischen Zusammenhang. DNA-Doppelstrangbrüche sind seit längerem als eine der signifikantesten Auswirkungen ionisierender Strahlung bekannt (Khanna *et al.* 2001). DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüche führen zu genetischer Instabilität und können die Rate der Krebsentstehung erhöhen (Vamvakas *et al.* 1997). Schon ein einziger Doppelstrangbruch kann zum Untergang einer Zelle führen, wenn ein wichtiges Gen inaktiviert oder Apoptose ausgelöst wird (Rich *et al.* 2000).

Das Verfahren der Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen durch Immunfluoreszenzfärbung von γ -H2AX-Foci ist ein neuer Ansatz, der erstmals direkte Aussagen zu den molekularbiologischen Auswirkungen der ionisierenden Strahlung im Organismus machen kann.

Mit diesem Verfahren wurde bei 20 Patienten die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle während einer perkutanen transluminalen Angioplastie zu folgenden Zeitpunkten bestimmt: Unmittelbar vor der ersten Röntgenstrahlenexposition, 5 min nach der letzten Röntgenstrahlenexposition, sowie 1 h, 6 h und 24 h nach der Untersuchung. Alle Patienten erhielten eine perkutane transluminale Angioplastie der unteren Extremität. Naturgemäß variierten dabei die Durchleuchtungszeit und die Zahl der angefertigten Röntgenaufnahmen. Das übliche Maß der Strahlenexposition für eine PTA, das Dosisflächenprodukt (DFP), lag deshalb zwischen 6,31 und 30,36 Gy·cm².

Bei drei Patienten erfolgte zusätzlich eine Blutentnahme aus der Vena femoralis auf der Seite der behandelten Extremität zu folgenden Zeitpunkten: unmittelbar vor der ersten

Röntgenstrahlenexposition, 5 min nach der ersten Röntgenstrahlenexposition, 10 min der ersten Röntgenstrahlenexposition und 5 min nach der letzten Röntgenstrahlenexposition.

Im systemischen Kreislauf stieg die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle in der Blutprobe 5 min nach der Untersuchung im Vergleich zur Blutprobe unmittelbar vor der Untersuchung gemittelt über alle 20 Patienten um den Faktor 9,08 an (min. 4,08; max. 20,67). Im Vergleich mit der Dosiszunahme nach einer Computertomographie kann hier von einer deutlich höheren Rate an DNA-Doppelstrangbrüchen gesprochen werden. Im maximalen Fall erreichte die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in der Blutprobe 5 min nach der Untersuchung im Vergleich zur Blutprobe unmittelbar vor der Untersuchung bei einem DFP von $30,36 \text{ Gy}\cdot\text{cm}^2$ den 20,7-fachen Wert. Angesichts der Tatsache, dass während einer PTA der unteren Extremität nur periphere Anteile des Körpers, und damit auch nur relativ geringe Anteile des Blutvolumens, einer direkten Strahlenexposition ausgesetzt sind, sind diese Werte überraschend hoch.

Die Dosiszunahme in der Blutprobe 5 min nach der Untersuchung im Vergleich zur Blutprobe unmittelbar vor der Untersuchung betrug hochgerechnet pro $10 \text{ Gy}\cdot\text{cm}^2$ durchschnittlich $6,56 \pm 0,48$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes). Es lässt sich folgende Näherungsformel zur Abschätzung der Proportionalität von Dosiszunahme und DFP aufstellen:

$$\frac{\frac{\text{Ø Foci pro Zelle 5 min post PTA}}{\text{Ø Foci pro Zelle prä PTA}}}{DFP}$$

so ergibt sich für die 20 Patienten ein Bereich von 0,58 bis 0,71 (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes: $0,656 \pm 0,048$). Der Korrelationskoeffizient zwischen DFP und Focizunahme nach Bravais-Pearson betrug 0,993. Somit kann auch hier von einer direkten Proportionalität ausgegangen werden. Dies macht das Verfahren der Quantifizierung der γ -H2AX-Foci in Lymphozyten des peripheren Blutes zu einem sensitiven und hinreichend genauen „biologischen Dosimeter“ auch bei lokalisierter Strahlungsexposition einer Extremität beispielsweise im Rahmen einer PTA.

Bereits zum Zeitpunkt der Lymphozytenentnahme 1 h nach der Untersuchung nahm die durchschnittliche Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zelle wieder ab. Im Gegensatz zu den Beobachtungen nach Computertomographie konnte hierbei allerdings nur eine unvollständige Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche nach 24 h beobachtet werden. Das durchschnittliche Verhältnis der γ -H2AX-Foci pro Zelle 24 h nach der Untersuchung im Vergleich zu unmittelbar vor der Untersuchung entspricht einem Niveau von $149 \% \pm 37 \%$ des Ausgangswertes. Der

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zwischen vor der Untersuchung und 24 h nach der Untersuchung zeigt einen signifikanten Unterschied ($P = 0,0091$), die Teststärke ($1-\beta$) liegt bei 99,8 %. Leider wurden im Rahmen dieser Studie keine späteren Blutentnahmen vorgenommen. Zukünftige Studien sollten klären wie lange der Zeitraum ist bis die basale Hintergrundaktivität an DNA-Doppelstrangreparatur wieder erreicht ist.

Die Kinetik der Abnahme der Foci war bei allen 20 Patienten vergleichbar: 1 h nach der Untersuchung bestanden durchschnittlich noch $73 \% \pm 4 \%$ der Doppelstrangbrüche zum Zeitpunkt 5 min nach der Untersuchung, 6 h nach der Untersuchung noch $52 \% \pm 4 \%$.

Bei drei Patienten wurde zusätzlich zur peripheren Blutentnahme eine Blutentnahme aus der V. femoralis durchgeführt. Diese selektive Bestimmung im Blut der bestrahlten Extremität zeigte, dass die aus dem Bein refluxierenden Lymphozyten mehr Foci zeigen als Lymphozyten aus dem peripheren Blut. Auch nach der Verdünnung mit nicht-exponierten Lymphozyten und der Entnahme aus einer peripheren Vene sind die Foci immer noch zahlreich genug, um nachweisbar zu sein, so dass man die weniger invasive Methode der peripheren Blutentnahme nutzen kann, um die biologische Wirkung der Röntgenstrahlung zu messen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der maximale Wert der Dosiszunahme in den Lymphozyten, die direkt aus dem Blutabfluss der behandelten Extremität entnommen wurden, im Vergleich zu den Lymphozyten aus dem systemischen Kreislauf durchschnittlich um den Faktor $1,46 \pm 0,20$ höher war. Dies entspricht unseren Erwartungen, wobei für einen definitiven Beweis simultane Blutentnahmen aus der behandelten Extremität und dem systemischen Kreislauf sowie die Durchführung einer Dispersionsanalyse erforderlich wären. Da der individuelle Verlauf der Strahlenexposition bei einem Patienten je nach Ablauf der Behandlung sehr stark variieren kann, ist auch in den drei Daten keine proportionale Erhöhung mit der Zeit zu finden.

Zusammenfassend sind deutliche Unterschiede im Vergleich zur Strahlenexposition nach Computertomographie feststellbar. Einerseits fanden wir eine erhöhte Rate von DNA-Doppelstrangbrüchen in Lymphozyten der systemischen Zirkulation und eine noch höhere Rate in der bestrahlten Extremität selbst, andererseits eine geringere absolute Rate an DNA-Doppelstrangbruchreparatur *in vivo* nach 24 h. Angesichts der besonderen Art der Röntgenbelastung während einer perkutanen transluminalen Angioplastie, sind auch hier signifikante Unterschiede zu anderen Röntgenverfahren feststellbar. Bei den 20 untersuchten Patienten lag zwischen der ersten und der letzten Röntgenexposition im Rahmen der PTA im Durchschnitt ein Zeitraum von 20 min, was deutlich länger als bei einer Computertomographie

ist. Hier könnte der Grund für die Unterschiede in der Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen liegen: möglicherweise müssen hier andere Effekte bedacht werden, als die bloße Kumulation der Strahlendosis. Denkbar ist beispielsweise eine Signifikanz des sogenannten Bystander-Effektes. In Experimenten mit einer Mikro-Ionenstrahl-Apparatur zur Exposition einzelner lebender Zellen konnte auch in Zellen ein schädigender Effekt nachgewiesen werden, die selbst keinen $^3\text{He}^{2+}$ -Ionen ausgesetzt waren, sondern lediglich solchen Zellen benachbart lagen (Shao *et al.* 2004; Sedelnikova *et al.* 2007). Ebenfalls ist bekannt, dass Zellen eine höhere Radiosensitivität gegenüber geringen Dosen ionisierender Strahlung besitzen, als dies aus Rückinterpolation der Ergebnisse bei höheren Dosen zu erwarten wäre. Dieser Effekt wird als „Low-dose hypersensitivity“ bezeichnet (Joiner *et al.* 2001; Bonner 2004). Rothkamm *et al.* zeigten 2003, dass durch niedrige Strahlendosen (bis 1 mGy) ausgelöste DSB für einige Tage unrepariert bleiben. Dies steht im Gegensatz zu der wesentlich effizienteren DSB-Reparatur bei höheren Dosen (Rothkamm *et al.* 2003). Unser Befund einer auch nach 24 Stunden noch erhöhten DNA-Doppelstrangbruchreparatur nach PTA unterstützt die Resultate von Rothkamm *et al.* 2003.

5.4 Methodik

Die Immunfluoreszenzfärbung von γ -H2AX-Foci eignet sich zur Darstellung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken von ionisierender Strahlung. Wie im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte, induziert ionisierende Strahlung γ -H2AX-Foci in einem der applizierten Dosis proportionalen Umfang. Es ist gegenwärtig allgemein akzeptiert, dass γ -H2AX-Foci in der Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen. Dieses Erklärungsmodell wird von einem großen Teil der vorliegenden Literatur unterstützt (Paull *et al.* 2000; Burma *et al.* 2001; Ward *et al.* 2001; Redon *et al.* 2002; Furuta *et al.* 2003; Fernandez-Capetillo *et al.* 2004; Foster *et al.* 2005; Halicka *et al.* 2005; Huang *et al.* 2005; Takahashi *et al.* 2005; Stucki *et al.* 2006). Auf der anderen Seite gibt es einige Wissenschaftler, die bezweifeln, dass γ -H2AX ausschließlich durch DNA-Doppelstrangbrüche induziert wird. Marti *et al.* konnten 2006 eine diffuse Phosphorylierung von H2AX während der G₁-Phase zeigen (Marti *et al.* 2006). Eine andere Arbeitsgruppe wies die Bildung von γ -H2AX-Foci nach MNNG-Exposition (N-Methyl-N'-Nitro-Nitroso-Guanidin) nach, die offenbar durch nichtreparable Läsionen verursacht wurden. Diese konnten nicht als DNA-Doppelstrangbrüche interpretiert werden (Stojic *et al.* 2004). Es bleibt also noch offen, ob die angewandte Methode zur γ -H2AX-Darstellung wirklich spezifisch DNA-Doppelstrangbrüche nachweist.

Die hier verwendete γ -H2AX-Methode vereint in sich einige der Anforderungen, die an ein ideales Verfahren zur biologischen Dosisbestimmung gestellt werden müssen: es ist sensitiv und ermöglicht bereits eine Messung im Bereich von wenigen Milligray, die Dosis-Wirkungs-Kurve verläuft über einen breiten Dosisbereich linear, die Proben können einfach gewonnen werden und es ist möglich, eine Exposition von Teilen des Körpers im systemisch zirkulierenden Blut zu detektieren. Dennoch limitieren einige Beschränkungen die allgemeine Anwendbarkeit: Der schnelle Verlust des Signals (ca. 50 % innerhalb der ersten Stunde) macht es einerseits unmöglich, eine Auswertung ohne genaue Kenntnis des Expositionszeitpunktes durchzuführen, andererseits können länger zurückliegende Ereignisse nicht mehr erfasst werden. Dies wäre beispielsweise zur Messung der Belastung bei Unfällen mit Röntgenstrahlung oder Radioaktivität wünschenswert. Darüber hinaus ist eine automatische Auswertung bisher nicht möglich, so dass eine manuelle und potentiell fehleranfällige Auszählung der Foci erforderlich ist.

5.5 Ausblick

Viele Aspekte der Schädigung und Reparatur der DNA sind noch unbekannt oder nur zum Teil verstanden. Hier müssen weitere Fortschritte in der Grundlagenforschung erzielt werden, um beispielsweise den genauen Interaktionsmechanismus zwischen ionisierender Strahlung und dem DNA-Molekül aufzudecken. Ebenso ist bisher noch unbekannt, wie und in welchem Maße ein DNA-Doppelstrangbruch zur Entstehung von Krebs führen kann. Zahllose Signaltransduktionskaskaden sind zwar bekannt, aber dennoch liegen große Teile der Krebsentstehung noch im Dunkeln. Welchen Einfluss der Bystander-Effekt oder die „Low-dose hypersensitivity“ *in vivo* auf die gezeigten Ergebnisse hat, gibt ebenfalls Anlass zu weiteren Forschungen. Angesichts der Daten von Rothkamm *et al.* (2003), die eine deutlich verzögerte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen bei niedrigen Strahldosen (≈ 1 mGy) zeigten, wäre eine längerfristige Untersuchung der Reparaturkinetik nach einer PTA sinnvoll.

Die hier verwendete Immunfluoreszenzfärbung von γ -H2AX-Foci eignet sich zur Darstellung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken von ionisierender Strahlung und ist dabei ein sensitives Verfahren. Um als ein biologisches Dosimeter für verschiedene Arten ionisierender Strahlung dienen zu können, wäre die Entwicklung einer automatisierten Auswertung der Proben möglich. Moderne Techniken der Labormedizin könnten hier entscheidende Impulse liefern. Mit diesem Verfahren zur Analyse der DNA-Doppelstrangbrüche könnte in Zukunft eine Dosisbestimmung in Fällen durchgeführt werden, in denen die konventionelle Dosimetrie an

ihre Grenzen stößt - beispielsweise bestimmte strahlentherapeutische Anwendungen oder komplexe interventionsradiologische Eingriffe. Auch eine Berücksichtigung der individuellen DNA-Reparaturkapazität beispielsweise bei einer Chemo- oder Strahlentherapie wäre denkbar.

Im Vergleich der Ergebnisse nach PTA mit den Ergebnissen der Computertomographie, wäre eine Anwendung des Verfahrens auf andere interventionsradiologische Verfahren interessant, beispielsweise bei neuroradiologischen Embolisationsverfahren oder einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie. Die Rad-IR-Studie gibt beispielsweise für eine Embolisation in den hirnversorgenden Gefäßen eine durchschnittliche kumulative Dosis von 3.762 mGy und eine durchschnittliche Dauer von 87,1 min an, was dem Vielfachen einer PTA entspricht (Miller *et al.* 2003). Die auch nach 24 Stunden nicht abgeschlossene DNA-Doppelstrangreparatur gibt Anlass zur Besorgnis und sollte unbedingt weitere Studien nach sich ziehen.

Interessant wäre auch eine genauere Untersuchung der möglichen Altersabhängigkeit sowohl der Menge an induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen als auch der Reparaturkinetik. Ebenfalls könnte eine Untersuchung der Abhängigkeit vom verwendeten Kontrastmittel weitere Erkenntnisse bringen.

Schließlich ist eine Untersuchung von anderen Zelltypen vorstellbar. Beispielsweise könnte eine Biopsie zur Analyse von Hautfibroblasten aus der behandelten Extremität zum direkten Nachweis der lokalen Strahlenfolgen durchgeführt werden.

Zuletzt kann die Methodik auch eingesetzt werden, um Strahlenwirkungen am therapeutisch Tätigen nachzuweisen. Gerade im Rahmen der Interventionsradiologie besteht trotz aller Strahlenschutzmaßnahmen eine Strahlenexposition des behandelnden Arztes und des assistierenden Personals. Messungen der DNA-Doppelstrangreparatur nach verschiedenen Eingriffen beim medizinischen Personal sollten Hinweise auf die biologische Strahlenwirkung geben können.

Literaturverzeichnis

- Balter, S., B. A. Schueler, D. L. Miller, P. E. Cole, H. T. Lu, A. Berenstein, R. Albert, J. D. Georgia, P. T. Noonan, E. J. Russell, T. W. Malisch, R. L. Vogelzang, M. Geisinger, J. F. Cardella, J. St George, G. L. Miller, 3rd und J. Anderson (2004). "Radiation doses in interventional radiology procedures: the RAD-IR Study. Part III: Dosimetric performance of the interventional fluoroscopy units." J Vasc Interv Radiol **15**(9): 919-26.
- Bauchinger, M. (1995). "Quantification of low-level radiation exposure by conventional chromosome aberration analysis." Mutat Res **339**(3): 177-89.
- Berrington de Gonzalez, A. und S. Darby (2004). "Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries." Lancet **363**(9406): 345-51.
- Bonner, W. M. (2004). "Phenomena leading to cell survival values which deviate from linear-quadratic models." Mutat Res **568**(1): 33-9.
- Brenner, D. J. (2004). "Radiation risks potentially associated with low-dose CT screening of adult smokers for lung cancer." Radiology **231**(2): 440-5.
- Brenner, D. J., R. Doll, D. T. Goodhead, E. J. Hall, C. E. Land, J. B. Little, J. H. Lubin, D. L. Preston, R. J. Preston, J. S. Puskin, E. Ron, R. K. Sachs, J. M. Samet, R. B. Setlow und M. Zaider (2003). "Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 13761-6.
- Brenner, D. J. und C. D. Elliston (2004). "Estimated radiation risks potentially associated with full-body CT screening." Radiology **232**(3): 735-8.
- Burma, S., B. P. Chen, M. Murphy, A. Kurimasa und D. J. Chen (2001). "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks." J Biol Chem **276**(45): 42462-7.
- Burma, S. und D. J. Chen (2004). "Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 909-18.
- Charles, M. (2001). "UNSCEAR report 2000: sources and effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation." J Radiol Prot **21**(1): 83-6.
- Chida, K., H. Saito, Y. Kagaya, M. Kohzuki, Y. Takai, S. Takahashi, S. Yamada und M. Zuguchi (2006). "Indicators of the maximum radiation dose to the skin during percutaneous coronary intervention in different target vessels." Catheter Cardiovasc Interv **68**(2): 236-41.
- Chu, R. Y., G. Thomas und F. Maqbool (2006). "Skin entrance radiation dose in an interventional radiology procedure." Health Phys **91**(1): 41-6.
- Cohen, J. (1988). Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale, N.J., L. Erlbaum Associates.
- Critchlow, S. E. und S. P. Jackson (1998). "DNA end-joining: from yeast to man." Trends Biochem Sci **23**(10): 394-8.
- D'Ercole, L., L. Mantovani, F. Z. Thyron, M. Bocchiola, A. Azzaretti, F. Di Maria, C. M. Saluzzo, P. Quaretti, G. Rodolico, P. Scagnelli und L. Andreucci (2007). "A study on maximum skin dose in cerebral embolization procedures." AJNR Am J Neuroradiol **28**(3): 503-7.
- Dawson, P. (2004). "Patient dose in multislice CT: why is it increasing and does it matter?" Br J Radiol **77 Spec No 1**: S10-3.
- Degrassi, F., M. Fiore und F. Palitti (2004). "Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs." Curr Med Chem Anticancer Agents **4**(4): 317-25.
- Dianov, G. L., P. O'Neill und D. T. Goodhead (2001). "Securing genome stability by orchestrating DNA repair: removal of radiation-induced clustered lesions in DNA." Bioessays **23**(8): 745-9.

- Doll, R. und R. Wakeford (1997). "Risk of childhood cancer from fetal irradiation." Br J Radiol **70**: 130-9.
- Dotter, C. T. und M. P. Judkins (1964). "Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction. Description of a New Technic and a Preliminary Report of Its Application." Circulation **30**: 654-70.
- Dudas, A. und M. Chovanec (2004). "DNA double-strand break repair by homologous recombination." Mutat Res **566**(2): 131-67.
- Fairbairn, D. W., P. L. Olive und K. L. O'Neill (1995). "The comet assay: a comprehensive review." Mutat Res **339**(1): 37-59.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, M. Nussenzweig und A. Nussenzweig (2004). "H2AX: the histone guardian of the genome." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 959-67.
- Foster, E. R. und J. A. Downs (2005). "Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair." Febs J **272**(13): 3231-40.
- Friedberg, E. C. (1995). "Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair." Trends Biochem Sci **20**(10): 381.
- Friedberg, E. C. (2003). "DNA damage and repair." Nature **421**(6921): 436-40.
- Friedberg, E. C. und E. C. Friedberg (2006). DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C., ASM Press.
- Furuta, T., H. Takemura, Z. Y. Liao, G. J. Aune, C. Redon, O. A. Sedelnikova, D. R. Pilch, E. P. Rogakou, A. Celeste, H. T. Chen, A. Nussenzweig, M. I. Aladjem, W. M. Bonner und Y. Pommier (2003). "Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes." J Biol Chem **278**(22): 20303-12.
- Gilbert, E. S. (2001). "Invited commentary: studies of workers exposed to low doses of radiation." Am J Epidemiol **153**(4): 319-22; discussion 323-4.
- Groves, A. M., K. E. Owen, H. M. Courtney, S. J. Yates, K. E. Goldstone, G. M. Blake und A. K. Dixon (2004). "16-detector multislice CT: dosimetry estimation by TLD measurement compared with Monte Carlo simulation." Br J Radiol **77**(920): 662-5.
- Gruntzig, A. und H. Hopff (1974). "[Percutaneous recanalization after chronic arterial occlusion with a new dilator-catheter (modification of the Dotter technique) (author's transl)]." Dtsch Med Wochenschr **99**(49): 2502-10, 2511.
- Halicka, H. D., X. Huang, F. Traganos, M. A. King, W. Dai und Z. Darzynkiewicz (2005). "Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis." Cell Cycle **4**(2): 339-45.
- Hansen, J. C. (2002). "Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 361-92.
- Hewitson, T. D., T. Bisucci und I. A. Darby (2006). "Histochemical localization of apoptosis with in situ labeling of fragmented DNA." Methods Mol Biol **326**: 227-34.
- Heyne, J. P., H. Merbold, J. Sehner, R. Neumann, R. Adler, M. Freesmeyer und W. A. Kaiser (2000). "Reduktion der Strahlendosis mittels Speicherfolienradiographie am Handphantom." Fortschr Röntgenstr **172**: 386-390.
- Heyne, J. P., H. Merbold, J. Sehner, R. Neumann, M. Freesmeyer, L. Jonetz-Mentzel und W. A. Kaiser (1999). "Reduktion der Strahlendosis mittels Speicherfolienradiographie im Vergleich zum konventionellen Film-Folien-System mit Rasterkassette am Schädelphantom." Fortschr Röntgenstr **171**: 54-59.
- Holje, G., O. Jarlman und L. Samuelsson (1997). "Radiation doses and image information in digital pelvimetry with a phosphorous screen." Acta Radiol **38**(1): 181-4.
- Holliday, R. und T. Ho (2002). "DNA methylation and epigenetic inheritance." Methods **27**(2): 179-83.

- Hounsfield, G. N. (1973). "Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system." *Br J Radiol* **46**(552): 1016-22.
- Huang, X., H. D. Halicka, F. Traganos, T. Tanaka, A. Kurose und Z. Darzynkiewicz (2005). "Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis." *Cell Prolif* **38**(4): 223-43.
- Hussain, S. P. und C. C. Harris (2006). "p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis." *J Nippon Med Sch* **73**(2): 54-64.
- International Commission on Radiological Protection (2000). "Managing patient dose in computed tomography. A report of the International Commission on Radiological Protection." *Ann ICRP* **30**(4): 7-45.
- Jackson, S. P. (2002). "Sensing and repairing DNA double-strand breaks." *Carcinogenesis* **23**(5): 687-96.
- Jakob, B., M. Scholz und G. Taucher-Scholz (2003). "Biological imaging of heavy charged-particle tracks." *Radiat Res* **159**(5): 676-84.
- Joiner, M. C., B. Marples, P. Lambin, S. C. Short und I. Turesson (2001). "Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **49**(2): 379-89.
- Khanna, K. K. und S. P. Jackson (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." *Nat Genet* **27**(3): 247-54.
- Land, C. E. (1980). "Estimating cancer risks from low doses of ionizing radiation." *Science* **209**(4462): 1197-203.
- Le Heron, J. C. (1992). "Estimation of effective dose to the patient during medical x-ray examinations from measurements of the dose-area product." *Phys Med Biol* **37**(11): 2117-26.
- Leppard, J. B., Z. Dong, Z. B. Mackey und A. E. Tomkinson (2003). "Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5919-27.
- Lindahl, T. und B. Nyberg (1974). "Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid." *Biochemistry* **13**(16): 3405-10.
- Lobrich, M., P. K. Cooper und B. Rydberg (1996). "Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation." *Int J Radiat Biol* **70**(5): 493-503.
- Lobrich, M. und J. Kiefer (2006). "Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy." *Int J Cancer* **118**(11): 2652-6.
- Lobrich, M., N. Rief, M. Kuhne, M. Heckmann, J. Fleckenstein, C. Rube und M. Uder (2005). "In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(25): 8984-9.
- Luger, K. (2003). "Structure and dynamic behavior of nucleosomes." *Curr Opin Genet Dev* **13**(2): 127-35.
- Mannironi, C., W. M. Bonner und C. L. Hatch (1989). "H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals." *Nucleic Acids Res* **17**(22): 9113-26.
- Marti, T. M., E. Hefner, L. Feeney, V. Natale und J. E. Cleaver (2006). "H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(26): 9891-6.
- Mastora, I., M. Remy-Jardin, V. Delannoy, A. Duhamel, C. Scherf, C. Suess und J. Remy (2004). "Multi-detector row spiral CT angiography of the thoracic outlet: dose reduction with anatomically adapted online tube current modulation and preset dose savings." *Radiology* **230**(1): 116-24.
- Mersfelder, E. L. und M. R. Parthun (2006). "The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure." *Nucleic Acids Res* **34**(9): 2653-62.

- Miller, D. L., S. Balter, P. E. Cole, H. T. Lu, A. Berenstein, R. Albert, B. A. Schueler, J. D. Georgia, P. T. Noonan, E. J. Russell, T. W. Malisch, R. L. Vogelzang, M. Geisinger, J. F. Cardella, J. S. George, G. L. Miller, 3rd und J. Anderson (2003). "Radiation doses in interventional radiology procedures: the RAD-IR study: part II: skin dose." J Vasc Interv Radiol **14**(8): 977-90.
- Miller, D. L., S. Balter, P. E. Cole, H. T. Lu, B. A. Schueler, M. Geisinger, A. Berenstein, R. Albert, J. D. Georgia, P. T. Noonan, J. F. Cardella, J. St George, E. J. Russell, T. W. Malisch, R. L. Vogelzang, G. L. Miller, 3rd und J. Anderson (2003). "Radiation doses in interventional radiology procedures: the RAD-IR study: part I: overall measures of dose." J Vasc Interv Radiol **14**(6): 711-27.
- Mistretta, C. A. und A. B. Crummy (1981). "Diagnosis of cardiovascular disease by digital subtraction angiography." Science **214**(4522): 761-5.
- Morneburg, H. (1995). Röntgen- und Gammastrahlung. Bildgebende Systeme für die medizinische Diagnostik, Publicis MCD Verlag. **3. Auflage**: 84-108.
- Mountford, P. J. und D. H. Temperton (1992). "Recommendations of the International Commission on Radiological Protection (ICRP) 1990." Eur J Nucl Med **19**(2): 77-9.
- Nakamura, J., V. E. Walker, P. B. Upton, S. Y. Chiang, Y. W. Kow und J. A. Swenberg (1998). "Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions." Cancer Res **58**(2): 222-5.
- Norgren, L., W. R. Hiatt, J. A. Dormandy, M. R. Nehler, K. A. Harris, F. G. Fowkes, K. Bell, J. Caporusso, I. Durand-Zaleski, K. Komori, J. Lammer, C. Liapis, S. Novo, M. Razavi, J. Robbs, N. Schaper, H. Shigematsu, M. Sapoval, C. White und J. White (2007). "Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)." Eur J Vasc Endovasc Surg **33 Suppl 1**: S1-75.
- Paques, F. und J. E. Haber (1999). "Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 349-404.
- Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert und W. M. Bonner (2000). "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage." Curr Biol **10**(15): 886-95.
- Pilch, D. R., O. A. Sedelnikova, C. Redon, A. Celeste, A. Nussenzweig und W. M. Bonner (2003). "Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites." Biochem Cell Biol **81**(3): 123-9.
- Piraino, D. W., W. J. Davros, M. Lieber, B. J. Richmond, J. P. Schils, M. P. Recht, P. N. Grooff und G. H. Belhobek (1999). "Selenium-based digital radiography versus conventional film-screen radiography of the hands and feet: a subjective comparison." AJR Am J Roentgenol **172**(1): 177-84.
- Radon, J. (1917). "Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeit." Leipzig, Ber. Verh. Sächs. Akad. Wiss., Math. Phys. Kl. **69**: 262-277.
- Redon, C., D. Pilch, E. Rogakou, O. Sedelnikova, K. Newrock und W. Bonner (2002). "Histone H2A variants H2AX and H2AZ." Curr Opin Genet Dev **12**(2): 162-9.
- Rich, T., R. L. Allen und A. H. Wyllie (2000). "Defying death after DNA damage." Nature **407**(6805): 777-83.
- Riley, P. A. (1994). "Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation." Int J Radiat Biol **65**(1): 27-33.
- Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon und W. M. Bonner (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." J Cell Biol **146**(5): 905-16.
- Rogakou, E. P., W. Nieves-Neira, C. Boon, Y. Pommier und W. M. Bonner (2000). "Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139." J Biol Chem **275**(13): 9390-5.

- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova und W. M. Bonner (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." J Biol Chem **273**(10): 5858-68.
- Roth, F. J., A. Scheffler, W. Krings, B. Grün und I. Bathen (1996). Ballonangioplastie peripherer Gefäße. Interventionelle Radiologie. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag. **2**. Auflage: 81-97.
- Rothkamm, K., S. Balroop, J. Shekhdar, P. Fernie und V. Goh (2007). "Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure." Radiology **242**(1): 244-51.
- Rothkamm, K., I. Kruger, L. H. Thompson und M. Lobrich (2003). "Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle." Mol Cell Biol **23**(16): 5706-15.
- Rothkamm, K. und M. Lobrich (2003). "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5057-62.
- Rydberg, B. und T. Lindahl (1982). "Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction." Embo J **1**(2): 211-6.
- Schmidt, T. (1998). Strahlenschutz in Forschung und Praxis **41**: 105-113.
- Schneider, E., A. Gruntzig und A. Bollinger (1982). "[Percutaneous transluminal angioplasty (PTA) in stages III and IV of peripheral arterial occlusive disease]." Vasa **11**(4): 336-9.
- Schrader, C. E., E. K. Linehan, S. N. Mochegova, R. T. Woodland und J. Stavnezer (2005). "Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG." J Exp Med **202**(4): 561-8.
- Sedelnikova, O. A., A. Nakamura, O. Kovalchuk, I. Koturbash, S. A. Mitchell, S. A. Marino, D. J. Brenner und W. M. Bonner (2007). "DNA Double-Strand Breaks Form in Bystander Cells after Microbeam Irradiation of Three-dimensional Human Tissue Models." Cancer Res **67**(9): 4295-302.
- Sedelnikova, O. A., E. P. Rogakou, I. G. Panyutin und W. M. Bonner (2002). "Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody." Radiat Res **158**(4): 486-92.
- Shao, C., M. Folkard, B. D. Michael und K. M. Prise (2004). "Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13495-500.
- Stojic, L., N. Mojas, P. Cejka, M. Di Pietro, S. Ferrari, G. Marra und J. Jiricny (2004). "Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase." Genes Dev **18**(11): 1331-44.
- Stucki, M. und S. P. Jackson (2006). "gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes." DNA Repair (Amst) **5**(5): 534-43.
- Takahashi, A. und T. Ohnishi (2005). "Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks?" Cancer Lett **229**(2): 171-9.
- Tripodi, D., S. Lyons und D. Davies (1971). "Separation of peripheral leukocytes by Ficoll density gradient centrifugation." Transplantation **11**(5): 487-8.
- Valerie, K. und L. F. Povirk (2003). "Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair." Oncogene **22**(37): 5792-812.
- Vamvakas, S., E. H. Vock und W. K. Lutz (1997). "On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis." Crit Rev Toxicol **27**(2): 155-74.
- Wang, Z. (2001). "DNA damage-induced mutagenesis : a novel target for cancer prevention." Mol Interv **1**(5): 269-81.
- Ward, I. M. und J. Chen (2001). "Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress." J Biol Chem **276**(51): 47759-62.
- Ward, J. F. (1988). "DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **35**: 95-125.

- West, M. H. und W. M. Bonner (1980). "Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species." Biochemistry **19**(14): 3238-45.
- Whitaker, S. J., S. N. Powell und T. J. McMillan (1991). "Molecular assays of radiation-induced DNA damage." Eur J Cancer **27**(7): 922-8.
- Wright, D. J., L. Godding und C. Kirkpatrick (1995). "Technical note: digital radiographic pelvimetry--a novel, low dose, accurate technique." Br J Radiol **68**(809): 528-30.

Zusammenfassung

Ionisierende Strahlung kann zu einer Reihe von schädigenden Effekten beim Menschen führen, der wichtigste darunter ist die Induktion eines malignen Zellwachstums (Krebs). DNA-Doppelstrangbrüche gehören dabei zu den bedeutendsten Schäden und können die Karzinogenese initiieren (Dianov *et al.* 2001; Khanna *et al.* 2001; Jackson 2002; Burma *et al.* 2004). Es wurde in der letzten Zeit in mehreren Studien (Lobrich *et al.* 2005; Rothkamm *et al.* 2007) gezeigt, dass die Immunfluoreszenzdarstellung von γ -H2AX-Foci *in vivo* bei Lymphozyten zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen anwendbar ist und der Verlust von γ -H2AX-Foci mit Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche korreliert. Eine bedeutende Quelle ionisierender Strahlung in der Medizin ist die interventionelle Radiologie, deren kumulative Dosis sich laut der RAD-IR Studie für verschiedene interventionsradiologische Maßnahmen im Bereich von 1.284 mGy bei einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) bewegt (Miller *et al.* 2003). Bei einem interventionsradiologischen Eingriff wird der Patient im Allgemeinen über einen deutlich längeren Zeitraum (bis zu einer Stunde) ionisierender Strahlung ausgesetzt als bei konventionellen Röntgenaufnahmen oder während einer Computertomographie.

Als Vergleichsgruppe wurde bei 5 Patienten (2 Frauen, 3 Männer) im Alter von durchschnittlich 64,6 Jahren die Rate an DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer Computertomographie (CT) zu folgenden Zeitpunkten untersucht: vor der CT sowie 5 min, 1 h, 6 h und 24 h nach der CT. Bei 20 Patienten (6 Frauen, 14 Männer) im Alter von durchschnittlich 68,5 Jahren wurde die Rate an DNA-Doppelstrangbrüchen nach einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) der unteren Extremität zu folgenden Zeitpunkten untersucht: vor der PTA sowie 5 min, 1 h, 6 h und 24 h nach der PTA. Bei 3 Patienten erfolgte zusätzliche eine Blutentnahme direkt aus der bestrahlten Extremität.

Bei der Computertomographie betrug die Dosiszunahme in der Blutprobe 5 min nach CT im Vergleich zur Blutprobe vor CT hochgerechnet pro 1.000 mGy·cm durchschnittlich $7,78 \pm 0,37$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes [SEM]). Der Korrelationskoeffizient zwischen DLP und Focizunahme nach Bravais-Pearson (r) betrug 0,997. Nach 24 h zeigt sich eine vollständige Reparatur der Doppelstrangbrüche. Diese Ergebnisse liegen im Bereich der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, ebenso die Reparaturkinetik.

Bei der perkutanen transluminalen Angioplastie zeigten sich deutliche Unterschiede im Vergleich zur Computertomographie. Die Dosiszunahme in der Blutprobe 5 min nach PTA im Vergleich zu unmittelbar vor der PTA betrug hochgerechnet pro 10 Gy·cm² durchschnittlich

$6,56 \pm 0,48$ (Mittelwert \pm SEM). Das Dosisflächenprodukt (DFP) korrelierte gut mit der Dosiszunahme, r betrug 0,993. Im Gegensatz zu den Beobachtungen nach CT beobachtete man hierbei eine unvollständige Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche nach 24 h. Das durchschnittliche Verhältnis der γ -H2AX-Foci pro Zelle 24 h nach PTA im Vergleich zu unmittelbar vor PTA entspricht einem Niveau von $149 \% \pm 37 \%$ des Ausgangswertes (P einseitig = 0,0091). Die Kinetik der Abnahme der Foci war dabei bei allen 20 Patienten vergleichbar. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass der maximale Wert der Dosiszunahme in den Lymphozyten, die direkt aus dem Blutabfluss der behandelten Extremität entnommen wurden, im Vergleich zu den Lymphozyten aus dem systemischen Kreislauf durchschnittlich um den Faktor $1,46 \pm 0,20$ höher war.

Die Immunfluoreszenzdarstellung von γ -H2AX-Foci eignet sich zur Darstellung der Formierung und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach perkutaner transluminaler Angioplastie. Zur Interpretation der Ergebnisse müssen aber möglicherweise noch andere Effekte berücksichtigt werden, als die bloße Kumulation der Strahlendosis. Beispielsweise sollen hier der Bystander-Effekt (Shao *et al.* 2004; Sedelnikova *et al.* 2007) oder die höhere Radiosensitivität gegenüber geringen Dosen ionisierender Strahlung und die unvollständige Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Strahlendosis im Bereich von 1 mGy (Joiner *et al.* 2001; Rothkamm *et al.* 2003) angeführt werden.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen in dieser Version entfernt.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren in Marburg, denen ich an dieser Stelle herzlich danke:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Bien, Berger, Bertalanffy, Cetin, Daut, Engel, Eschenbach, Feuser, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Göke, Görg C., Görg K., Gotzen, Gressner, Grimm, Griss, Grzeschik, Gudermann, Haas, Habermehl, Happle, Hasilik, Havemann, Hesse, Heubel, Hofbauer, Holst, Hoyer, Hufmann, Joseph, Kaffarnik, Kann, Kern, Klose, Kleine, Klenk, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lange, Lenz, Leppek, Lill, Liss, Lohoff, Löffler, Lorenz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Oertel, Peters, Pfab, Schäfer, Remschmidt, Renz, Richter, Riedmiller, Roeper, Röhn, Rothmund, Schachtschabel, Schmidt, Schnabel, Schulz, Seitz, Seyberth, Siegel, Simon, Steiniger, Vogelmeier, Voigt, Weihe, Werner, Westermann.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Wagner und Herrn Prof. Dr. Klaus Jochen Klose danke ich für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit in der radiologischen Abteilung der Philipps-Universität Marburg.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. rer. physiol. Johannes T. Heverhagen und Herrn PD Dr. med. Marc Kalinowski für die Unterstützung während meiner Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Andreas Kießling, Herrn Dr. Titus Freiherr Schenck zu Schweinsberg und Herrn Dr. Jens Figiel für die Unterstützung bei der Aufklärung der Patienten über die Studie sowie bei allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfe.

Frau Beate Kleb danke ich für die Unterstützung bei der Verarbeitung der Proben und der Immunfluoreszenzfärbung. Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Klinik für Nuklearmedizin, insbesondere Herrn Dr. Martin Béhé, für die Ermöglichung der Mitbenutzung des nuklearmedizinischen Labors.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Zuletzt möchte ich bei meiner Frau Olga bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation jederzeit unterstützt hat und ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „DNA-Doppelstrangbrüche nach interventionsradiologischen Eingriffen“ in der Klinik für Strahlendiagnostik unter Leitung von Prof. Dr. med. Klaus Jochen Klose mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Hans-Joachim Wagner ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Geisel D, Heverhagen JT, Kalinowski M, Wagner HJ. *DNA double-strand breaks after percutaneous transluminal angioplasty*. **Radiology**. 2008 Sep; 248(3):852-9.

Ort, Datum, Unterschrift